



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DOSEAMENTO DE METABOLITOS URINÁRIOS DO TOLUENO EM TOXICOLOGIA OCUPACIONAL

Trabalho submetido por
Filipa Rosado Bártolo Malta Barbosa
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

junho de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DOSEAMENTO DE METABOLITOS URINÁRIOS DO TOLUENO EM TOXICOLOGIA OCUPACIONAL

Trabalho submetido por
Filipa Rosado Bártolo Malta Barbosa
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof.(a) Doutora Maria Edite da Silva Oliveira Torres

junho de 2017

“Filipa, nunca te esqueças que um profissional de sucesso terá de ser um eterno estudante.”

Professor Doutor João Caramês

Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa

Mensagem inscrita na fita de final de curso para a Bênção das Pastas

Agradecimentos

Na realização do presente trabalho gostaria de deixar o meu especial agradecimento a personalidades que me disponibilizaram uma valiosa orientação e apoio, determinantes na forma pela qual o mesmo pode decorrer e se desenvolveu.

A **Professora Doutora Edite de Oliveira Torres** não só pela superior orientação, mas também por todo o grande apoio, amizade e motivação que sempre me transmitiu em todos os momentos do projeto, mesmo nos que aparentavam ser menos promissores. Muito obrigada.

Ao **Professor Doutor Alexandre Quintas**, pela confiança depositada, autorizando a minha presença no Laboratório de Patologia Molecular, e disponibilidade em ajudar e esclarecer dúvidas sobre o trabalho sempre que necessitei.

Merecem também especial agradecimento e reconhecimento, a **Força Aérea Portuguesa**, desde logo na pessoa de **Sua Excelência o Sr. General Chefe do Estado Maior da Força Aérea** que aceitou a participação no projeto da Base aérea nº6, como ainda ao **Major Carlos Bonito**, o **Capitão Bruno Silveira** e a todos os elementos colaboradores das equipas de manutenção de estrutura e pintura. Ainda ao **Aeródromo Municipal de Cascais**, destacando toda a boa receptividade e acolhimento do **Eng. Rui Estrela**, **Sr. Justino Borralho** e respetivas equipas de manutenção de aeronaves.

Finalmente, um especial e sentido agradecimento à minha família e aos meus amigos: aos meus **pais**, pelos bons conselhos que me transmitiram e grande apoio em todos os momentos. Deram, ao longo destes anos, sempre prova de enorme amor e compreensão. Ao meu **irmão João**, pelo exemplo, pela confiança que sempre depositou em mim grande apoio, motivação, amizade e amor. Aos meus **avós**, sempre presentes, deixo também o mais profundo agradecimento por toda a amizade, carinho e incondicional apoio, que sempre me proporcionaram. Aos meus **tios João Caramês e Inês** e aos meus **primos, Gonçalo, João e Francisco**, agradeço todo o apoio e grande amizade. Ao **José Miguel Valente**, agradeço e reconheço a grande amizade, suporte, amor, carinho, compreensão e paciência pelo tempo que lhe foi subtraído. À **Graciela Granda Gill**, à **Zahra Kará**, à **Mafalda Alves Ferreira**, à **Rita Neves**, ao **Pedro Gaibino da Silva** e a todos os meus amigos que me acompanham e fazem parte da minha vida, agradeço profundamente os anos de sincera amizade e apoio nos diferentes momentos da minha vida. **Muito obrigada!**

Resumo

A – O Tolueno e a Toxicologia Ocupacional

O presente estudo enquadra-se no âmbito da **Toxicologia Ocupacional** e propõe-se investigar os níveis de ácido hipúrico - metabolito resultante da biotransformação do tolueno – presente na urina de um grupo de técnicos de manutenção de aeronaves sujeitos a exposição continuada, em ambiente industrial, a estes produtos.

B – Etapas do projeto

Para desenvolvimento do projeto contemplámos **duas etapas**:

Uma **primeira etapa**, prévia ao desenvolvimento da investigação focada no objetivo enunciado em A que consistiu na definição e otimização de um protocolo sequencial de procedimentos analíticos e que culminaram na escolha da **Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa (GC-MS)**, como método a utilizar.

E, uma **segunda etapa**, que incidiu sobre a amostra selecionada: 25 técnicos de manutenção de aeronaves, junto dos quais se procedeu à recolha continuada de amostras (duas vezes por semana, por um período de 2 meses), posteriormente analisadas com recurso ao protocolo sequencial de procedimentos definidos na ETAPA 1, para determinação do ácido hipúrico urinário.

C – Relatórios do projeto

O primeiro relatório contemplou, o desenvolvimento da ETAPA 1 e constituiu o corpo do trabalho para a unidade curricular de **Iniciação à Investigação I**.

A ETAPA 2, seguidamente aprofundada e desenvolvida é apresentada na presente **Monografia final**, na qual se inclui, também, para completo enquadramento dos trabalhos efetuados, referência ao relatório da ETAPA 1.

Palavras-Chave:

Ácido Hipúrico; Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa; Tolueno; Toxicologia Ocupacional.

Abstract

A - Toluene and Occupational Toxicology

This study falls within the scope of **Occupational Toxicology** and intends to investigate the hippuric acid levels - resulting metabolite of toluene biotransformation - present in a group of aircraft maintenance technicians with continued exposure in industrial environment, to these products.

B - Project Steps

The project development contemplated **two steps**:

Step one, prior to the development of the research focused in the objective set out in A, which consisted in defining and optimizing a sequential protocol of analytical procedures that culminated with the election of **Gas Chromatography for Mass Spectrometry (GC- MS)** as the method to be used.

Step two, which focused on the subject of the study : A group of 25 aircraft maintenance technicians, from whom a continued urine sampling (twice a week for a period of 2 months), were collected and afterwards analyzed using the protocol sequential procedures defined in STEP 1, for the determination of urinary hippuric acid.

C - Project Reports

The first report covered the development of STEP 1 and is the substance of the work for the course of Research Introduction I.

STEP 2, now presented, is deepened developed in this Master's Thesis, which also includes the complete framework of the work carried out, in STEP 1.

Key-Words

Hippuric Acid; Gas Chromatography for Mass Spectrometry; Toluene; Occupational Toxicology.

Índice Geral

Resumo	1
Abstract	2
Índice Geral	3
Índice de Tabelas	5
Índice de Figuras	7
Lista de Abreviaturas	9
I. Enquadramento do Projeto	10
I.1 - Fundamentação Científica	10
I.1.1 - Solventes orgânicos e o Tolueno	10
I.1.2 - Processo de Biotransformação	13
I.1.3 - Patologias descritas associadas à exposição ocupacional	14
I.1.4 - Saúde Pública: utilização abusiva	15
I.1.5 - “Chronic Painter’s Syndrome”	16
I.1.5.1 - Caso Clínico 1	16
I.1.5.2 - Caso Clínico 2	19
I.1.5.3 - Caso Clínico 3	21
I.2 - Métodos Analíticos - Protocolo Sequencial	23
I.2.1 - High Performance Liquid Cromotography HPLC	23
I.2.2 - Sequência de procedimentos adotada para tratamento e preparação das amostras	24
I.1.2.1 - Solid-Phase Extraction SPE	25
I.1.2.2 - Processo de Derivatização	28
I.1.2.3 - Gas Cromotography - Mass Spectrometry GC-MS	29

II. Desenvolvimento do Projeto - Métodos	31
II.1 - Procedimentos Éticos	31
II.2 - Amostra Populacional e Obtenção das Amostras	31
II.3 - Desenvolvimento do Trabalho Analítico	34
II.3.1 - High Performance Liquid Cromotography HPLC	34
II.3.2 - Preparação e Tratamento das Amostras	35
II.3.3 - Processo de Derivatização	36
II.3.3 - Condições de Gas Cromotography - Mass Spectrometry GC-MS	37
III. Apresentação de Resultados	40
III.1 - Resultados ETAPA 1	40
III.1.1 - Otimização do Método	40
III.2 - Resultados ETAPA 2	44
III.2.1 – Análise e tratamento das Amostras	44
IV. Discussão de Resultados	46
V. Conclusão	50
VI. Referencias Bibliográficas	51
VII. Anexos	

Índice de Figuras

Figura 1.: Mecanismo de biotransformação do tolueno, no organismo humano (Adaptado de IPCS (1985), Environmental Health Criteria 52: Toluene, World Health Organization, Geneva).	14
Figura 2.: Linha cronológica de exposição - avaliação e evolução dos sintomas do doente (Adaptado de Feldman, R., et al., 1999).	17
Figura 3.: Ressonância Magnética do doente com Encefalopatia Cerebral Tóxica (ECT). As imagens revelam hipertrofia de substância branca e cinzenta, causada por uma alteração metabólica exógena. As lesões apresentadas, de forma simétrica (característica desta patologia), são irreversíveis e ocorrem após uma exposição muito prolongada a substâncias tóxicas (Feldman, R., et al., 1999).	17
Figura 4.: Ressonância Magnética de indivíduo normal, isto é, sem a presença de qualquer patologia (Feldman, R., et al., 1999).	18
Figura 5.: Ressonância Magnética: as imagens apresentam um padrão de lesões simétricas revelado por um hipersinal da substância branca (regiões brilhantes), característico da patologia em estudo e que revela alterações metabólicas por exposição a uma substância neurotóxica (Chih-Ming, L.; Chi-Kuang, L., 2014).	20
Figura 6.: Ressonância Magnética: (A) e (B) são imagens de difusão e (C) representa um mapa de Coeficiente Aparente de Difusão (ADC).	22
Figura 7.: Otimização da técnica por HPLC. Teste realizado com o padrão de 50 ppm de ácido hipúrico apresentando alteração tempo de retenção devido a variação dos fluxos: 0.6 (vermelho); 0.8 (verde) e 1 mL/min (azul).	24
Figura 8.: Fotografia do equipamento de Solid Phase Extraction (SPE) utilizado	28

Figura 9.: Derivatização do Ácido Hipúrico: ligação do grupo do Silício ao composto por substituição do grupo H do grupo ácido (adaptado de <i>National Institute of Standards and Technology</i> – NIST).	29
Figura 10.: Cromatógrafo Gasoso com detetor de Espectrometria de Massa (GC-MS) do Laboratório de Ciências Forenses e Psicológicas Egas Moniz (LCFPEM).	30
Figura 11.: Fotografia de um dos Hangar onde se realizava a manutenção das aeronaves.	32
Figura 12.: Fotografia de um dos recipientes de tolueno utilizados pelos trabalhadores para a limpeza das estruturas das aeronaves.	32
Figura 13.: Fotografia das amostras de urina recolhidas dos TMA's, já no laboratório.	33
Figura 14.: Fotografia dos cartuchos utilizados para a realização de SPE	36
Figura 15.: Molécula de ácido hipúrico (A) e molécula de ácido hipúrico parcialmente derivatizada (B). A derivatização seria completa se ocorresse nos dois prótons disponíveis – próton do NH e do OH do grupo ácido (NIST, 2011).	40
Figura 16.: Espectro de massa do ácido hipúrico conseguido através da fragmentação da molécula e respetivos fragmentos obtidos a partir dos padrões e das urinas, confirmados pela biblioteca NIST, 2011.	41
Figura 17.: Cromatograma obtido em modo SIM, referente à primeira análise de uma urina (de um trabalhador da Força Aérea Portuguesa), segundo as condições otimizadas para o método em estudo. Os tempos de retenção dos picos registados neste cromatograma são, para o ácido hipúrico (HA) e padrão interno (IS), respetivamente: 8, 964 minutos e 10, 868 minutos.	42
Figura 18.: Cromatograma referente à repetição da análise da urina (do mesmo trabalhador da Força Aérea Portuguesa, apresentado na Figura 17) após utilização do novo agente derivatizante. Os tempos de retenção registados com derivatização completa (DP) de HA e IS, foram respetivamente 8,152 minutos e 9,351 minutos.	43

Figura 19.: Curva de calibração obtida por GC-MS para diferentes concentrações: (Área HA/ Área IS) corresponde à razão das áreas dos picos de HA e IS, e HA à concentração das soluções padrão de ácido hipúrico (0 a 100 ppm). O ajuste linear é representado pela reta $Y = 0,106 \cdot X - 0,3041$, com $R^2 = 0,99625$. 45

Figura 20.: Valores médios, por indivíduo, das concentrações de HA detetadas na urina, nos dias da semana em que foram realizadas as colheitas. O gráfico representa a média \pm desvio padrão para $n=8$ e $n=7$, segundas e sextas-feiras, respetivamente. 45

Figura 21.: Representação do limite de exposição ao Tolueno, 20 ppm de HA em urina, estabelecido pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGHI), *Association of Advancing and Environmental Health*, 2007. 48

Índice de Tabelas

Tabela 1.: Limites de exposição ocupacional: Recomendações (Occupational Safety and Health Administration (OSHA) - United States Department of Labor)	12
Tabela 2.: Valores limite de exposição ao tolueno definidos para a União Europeia (EU), Reino Unido (UK), Estados Unidos da América (USA) e Coreia do Sul (SK), para períodos de 8 horas e tempos de curta duração (IFA, GESTIS – <i>International Limit Values</i>).	13
Tabela 3.: Síntese dos dados recolhidos da população amostral (organizações privadas e estatal), com base na avaliação dos inquéritos entregues	33
Tabela 4.: Protocolo de SPE aplicado, com recurso a cartuchos DSC-18 de fase reversa	35
Tabela 5.: Parâmetros de calibração do equipamento GC-MS ⁽¹⁾ ao método a aplicar	37
Tabela 6.: Gama de temperaturas aplicadas ao forno (<i>Oven Ramps</i>) – Esquema das temperaturas e respetivos intervalos de tempo	37
Tabela 7.: Classificação da Associação Portuguesa dos Dietistas , que permite distribuir e agrupar os indivíduos, com idade superior a 20 anos, tendo em consideração o resultado obtido	38
Tabela 8.: Regímen de trabalho dos TMA's da Força Aérea Portuguesa entre o período de Setembro e Dezembro	49

Lista de Abreviaturas

ACGHI – *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*

ATSDR – *Agency for Toxic Substances*

DC – Derivatização Completa

DP – Derivatização Parcial

ECT – Encefalopatia Cerebral Tóxica

EPA – US - *United States Protection Agency*

GC-MS – Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa

HA – Ácido Hipúrico (*Hippuric Acid*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ICH – *International Conference on Harmonization*

IS – Padrão Interno (*Internal Standard*)

ISCSEM – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

LCFPEM - Laboratório de Ciências Forenses e Psicológicas Egas Moniz

MMSE – Mini Exame de Estado Mental (*Mini Mental State Examination*)

MRI – Ressonância Magnética (*Magnetic Resonance Imaging*)

MSTFA - *N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)-Trifluoroacetamide*

NIST - *National Institute of Standards and Technology*

SD – Desvio Padrão (*Standard Deviation*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – *Solid Phase Extraction*

TMA – Técnico de Manutenção de Aeronaves

TR – Tempo de Retenção

I. Enquadramento do Projeto

I.1 – Fundamentação Científica

I.1.1 – Solventes orgânicos e o Tolueno

Os solventes orgânicos integram um grupo de substâncias amplamente utilizadas na indústria, sendo a maioria voláteis e lipofílicos. Estes apresentam elevados efeitos depressores ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo que certas substâncias compostas por solventes são sujeitas a abuso (*sniffing*), podendo-se referir as colas (**tolueno**, benzeno, acetona, xileno), a gasolina (hidrocarbonetos, chumbo), recargas para isqueiros (butano), as tintas acrílicas (**tolueno**), aerossóis (fluorcarbonetos) e produtos de limpeza (**tolueno** e hidrocarbonetos halogenados).

De entre os vários solventes referidos interessa-nos particularmente o tolueno, ou metil-benzeno, como também é designado. Trata-se um solvente, inflamável, incolor e extremamente volátil. Penetra facilmente no organismo humano, podendo por isso induzir lesões em diferentes órgãos. Este solvente apresenta um ponto de fusão de -95°C e um ponto de ebulição na ordem dos 111°C. A sua produção média anual na Europa ronda 1 milhão de toneladas. Estes valores de produção justificam-se tendo em consideração a vasta utilização deste solvente em diversas indústrias, ainda que nem sempre isoladamente, sendo por isso bastante frequente vê-lo em associação com outros solventes (SCOEL, 2001). Entre as aplicabilidades mais conhecidas do solvente orgânico em estudo há a referir a sua frequente utilização em combustíveis com a finalidade de melhorar a classificação de octanas, a sua procura na produção de *nylon*, plásticos e poliuretanos (Wartono, M., 2015).

Estudos realizados em animais sujeitos a uma exposição crónica (e prolongada) revelam evidência significativa de toxicidade, isto é, a presença de tolueno no ar e sua consequente inalação revelam que existe uma elevada capacidade de absorção pelo organismo, nomeadamente através de trato respiratório.

Também no estado líquido e em contacto com a pele, o tolueno é bastante absorvido. Uma vez assimilado, este solvente é amplamente distribuído, apresentando afinidade pelos tecidos gordos.

Em mulheres grávidas o tolueno tem a capacidade de atravessar a barreira placentária atingindo o feto, e em mulheres lactantes pode ser excretado e encontrado no leite materno.

Além dos efeitos depressores a nível do Sistema Nervoso Central (SNC), perante uma sujeição a elevados níveis de concentração de tolueno no ar - na ordem de milhares de ppm - após várias horas de exposição, pode também ocorrer narcose que poderá levar à morte (Kang, S.k. *et al.*., 2005). Voluntários humanos, após uma exposição a concentrações de tolueno de 75-150 ppm (287-575 mg/m³), durante várias horas, apresentaram sintomas de perturbação do SNC, tais como tonturas, cefaleias e fadiga e, simultaneamente, alterações a nível neuro-comportamental (SCOEL, 2001). O sistema respiratório pode igualmente ser afetado negativamente a nível dos recetores olfativos (Wartono, M., 2015).

Outros estudos referem ainda que este solvente atua como antagonista dos canais de sódio, atenuando a contratilidade cardíaca e levando à diminuição do ritmo cardíaco (Sanchez, O. *et al.*, 2010).

Nas Tabelas 1 e 2, (páginas 12 e 13, respetivamente), são apresentados os limites de exposição ocupacional ao tolueno, bem como as alterações observadas em indivíduos sujeitos a este, e os valores limite de exposição ao tolueno definidos para a União Europeia (EU), Reino Unido (UK), Estados Unidos da América (USA) e Coreia do Sul (SK), para períodos de 8 horas e tempos de curta duração. Os dados apresentados baseiam-se nos valores fornecidos pela *Occupational Safety and Health Administration (OSHA) - United States Department of Labor* e da *IFA, GESTIS – International Limit Values*, respetivamente.

Tabela 1.: Limites de exposição ocupacional: Recomendações (Occupational Safety and Health Administration (OSHA) - United States Department of Labor).

Organizações	Limites de exposição ao tolueno (ppm)	Alterações observadas
OSHA PEL – General Industry	200 ppm TWA	Depressão do SNC
	300 ppm	Fadiga
	500 ppm (pico – 10 minutos)	Cefaleias
OSHA PEL – Construction Industry	200 ppm (750mg/m ³) TWA	Parestesia
		Confusão
		Tonturas
OSHA PEL – Shipyards Employment	200 ppm (750mg/m ³) TWA	Descoordenação motora
		Irritação das mucosas e do trato respiratório superior
National Institute for Occupational Safety and Health – NIOSH REL	100 ppm (350mg/m ³) TWA	Fadiga
		Fraqueza
	150 ppm (560mg/m ³)	Confusão
		Cefaleias
		Tonturas
		Sonolência
American Conference of Governmental Industrial Hygienists – ACGIH TLV (2007)	20 ppm (75mg/m ³)	Perda de consciência
		Irritação ocular e do trato respiratório superior
CALIFORNIA (Cal) OSHA PELs	10 ppm (37mg/m ³) TWA	Alterações ao nível do sistema reprodutor feminino
		Aborto espontâneo
	500 ppm ceiling	Perturbações visuais e do SNC
		Perturbações visuais e auditivas
		Tonturas
	150 ppm (560mg/m ³) STEL skin	Cefaleias
		Alterações motoras e sensoriais
		Alterações comportamentais

Em que *TWA* corresponde a *Time Weighted Average*; *TLV* a *Threshold Limit Value*; *REL* a *Recommended Exposure Limit*; *PEL* a *Permissible Exposure Limit* e *STEL* a *Short Term Exposure Limit*.

Tabela 2.: Valores limite de exposição ao tolueno definidos para a União Europeia (EU), Reino Unido (UK), Estados Unidos da América (USA) e Coreia do Sul (SK), para períodos de 8 horas e tempos de curta duração (IFA, GESTIS – *International Limit Values*).

	Valor Limite de Exposição 8 hours		Valor Limite de Exposição Short Term	
	ppm	mg/m ³	ppm	mg/m ³
EUROPEAN UNION (EU)	50	192	100	384
UNITED KINGDOM (UK)	50	191	100	384
UNITED STATES OF AMERICA (USA) - NIOSH	100	375	150	560
SOUTH KOREA (SK)	50	188	150	560

I.1.2 – Processo de Biotransformação

Do catabolismo do tolueno resultam como metabolitos finais, o *orto*, *meta* e *para*-cresol e o ácido benzóico, os quais, ao conjugarem-se com a glicina, irão originar o ácido hipúrico (HA), (assim como outros compostos derivados deste), como está exemplificado na Figura 1 (página 13). O HA é um composto hidrossolúvel sendo de fácil excreção urinária (Sanchez, O. *et al.*, 2010).

Os ácidos hipúrico e metil-hipúrico sofrem, como acima referido, eliminação urinária, sendo frequentemente utilizados como indicadores biológicos para a avaliação da exposição ao tolueno e xileno, respetivamente. Desta forma a exposição ocupacional a estes solventes pode facilmente ser monitorizada pela excreção destes metabolitos (Artur, L. and Anderson, L., 2012).

Embora já tenham sido realizados diferentes estudos sobre os ácidos hipúricos noutros fluidos biológicos, nomeadamente sangue, constatou-se que a nível hematológico não foram detetadas quaisquer alterações em indivíduos expostos ao tolueno / xileno (Marchand, A. *et al.*, 2015).

De salientar que estes doseamentos são efetuados relativamente a um determinado período de tempo e a uma única substância, ou seja, não são contempladas possíveis interações entre diferentes compostos.

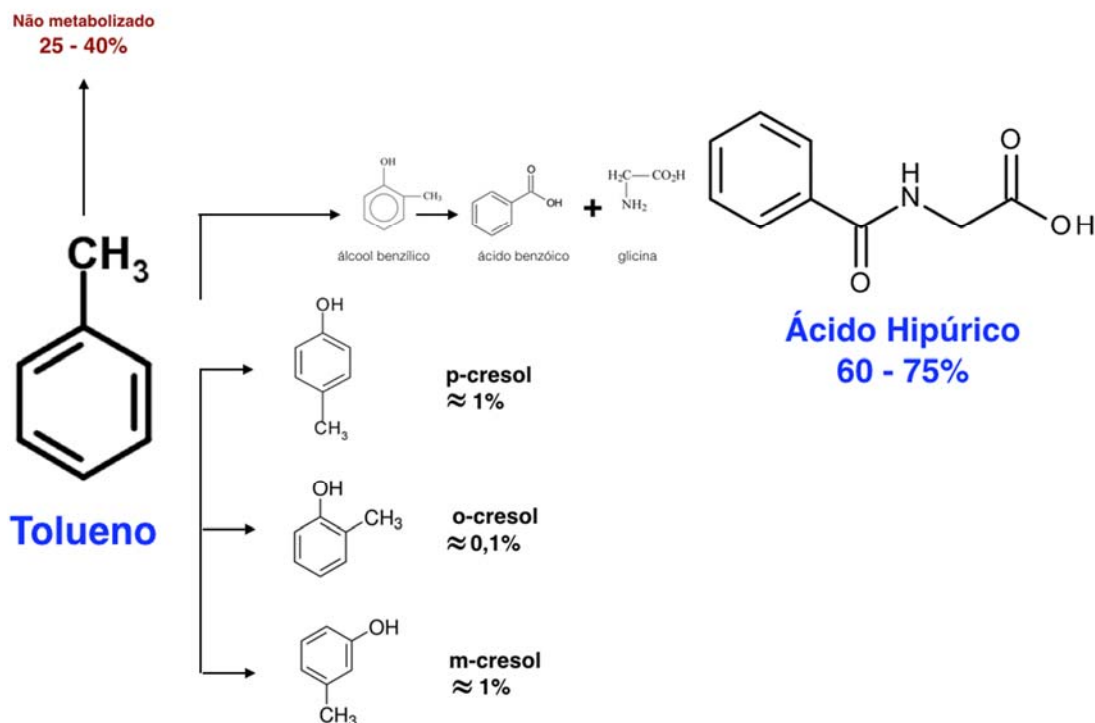


Figura 1.: Mecanismo de biotransformação do tolueno, no organismo humano (Adaptado de IPCS (1985), Environmental Health Criteria 52: Toluene, World Health Organization, Geneva).

I.1.3 – Patologias descritas associadas à exposição ocupacional

Para além dos efeitos psicotrópicos já descritos, como depressão do SNC, cefaleias, tonturas, sonolência e eventuais perdas de consciência, efeitos que consoante o nível e concentrações de exposição poderão ser reversíveis, ao nível de sequelas permanentes a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), publicou, em Setembro de 2015, dados atualizados relativamente a estes efeitos.

A ATSDR descreveu e incluiu: falta de coordenação motora, perda de capacidades cognitivas, perda auditiva e visual, insuficiência renal e hepática e efeitos sobre os sistemas reprodutor e imunitário. Estas consequências são fruto de uma exposição crónica e sobretudo encontram-se associadas aos casos de abuso e consumo intencional de tolueno.

Foi mencionado também, tendo em consideração algumas publicações, a possibilidade de aborto espontâneo em mulheres cuja atividade profissional se encontre sujeita à exposição ao tolueno, ou até mesmo o seu consumo abusivo.

Na década de 70 foram realizados diversos testes, bem como estudos que resultaram em diferentes publicações, não de cariz científico, mas político, que suspeitavam de um quadro de pré-senilidade e demência aquando da exposição ocupacional crónica a solventes orgânicos, em sujeitos cuja atividade profissional se encontrava relacionada com tintas, ou seja, pintores. Foi então descrito nesta altura pela primeira vez, o “**Síndrome dos Pintores**” (*The Painter’s Syndrome*) (Errebo-Knudsen, E. *et al.*, 1985). No sub-capítulo **I.1.5** são apresentados e descritos três casos clínicos distintos que descrevem detalhadamente este quadro clínico.

I.1.4 – Saúde Pública: utilização abusiva

O consumo abusivo de solventes orgânicos, nomeadamente do tolueno, pelos seus efeitos narcóticos e propriedades psicotrópicas é conhecido desde a década de 50, quando Clinger e Johnson relataram um surto de inalação (*sniffing*) de gasolina por um grupo de adolescentes (King, M., *et al.*, 1982). Desde então tornou-se evidente que o abuso de solventes, ou a sua inalação involuntária, poderia ser um grave problema de saúde pública a nível mundial. A fama destes compostos deve-se ao facto de muitos integrarem um “leque” de produtos de rápido e intensos efeitos e de fácil acesso – por se encontrarem largamente presentes na indústria, serem legais, comercialmente disponíveis e pouco dispendiosos - torna-os extremamente populares junto dos mais jovens (Shonagh K. O’Leary-Moore, *et al.*, 2009).

O mais recente estudo da *National Survey of Drug Use and Health* (2009), indica que 20,9% dos adolescentes com idades entre 12 e os 17 anos de idade consomem ilicitamente este tipo de substâncias, dos quais: 45,5% entre os 12 e os 13 anos e 28,4% entre os 14 e os 17 anos de idade. Relativamente ao tipo de substância adquirida e consumida, esta difere também com a idade. Ficou claro que o consumo de tolueno se verifica junto dos indivíduos entre os 12 e os 15 anos e os restantes optam pelo consumo de terebintina, um solvente orgânico presente no verniz utilizado para engraxar calçado (Shonagh K. O'Leary-Moore, *et al.*, 2009).

I.1.5 – “Chronic Painter’s Syndrome”

Seguidamente são apresentados três casos cujo quadro clínico resulta da exposição crónica ao tolueno e a outros solventes orgânicos. Os indivíduos apresentam uma atividade profissional comum, na qual a exposição diária a tintas esteve sempre presente.

I.1.5.1 – Caso Clínico 1

Indivíduo do sexo masculino, com 57 anos de idade, desde os 16 anos pintor de profissão em ambientes de ventilação deficiente e sem nunca usar qualquer tipo proteção das vias respiratórias (Feldman, R., *et al.*, 1999).

Primeiramente, o paciente em estudo começou por apresentar sinais de irritabilidade, perdas frequentes de memória, desorientação e insónia. Com a progressão gradual dos sintomas, além do agravamento do quadro já referido, cefaleias severas, tonturas e crises de ansiedade e depressão, passaram também a ser descritos pelo paciente, situação que o obrigou a abandonar a profissão, forçando a uma reforma aos 57 anos.

A linha de exposição seguinte (Figura 2, página 17), demonstra cronologicamente, a forma como o quadro clínico foi evoluindo, bem como o acompanhamento médico que o doente foi recebendo desde a sua reforma.

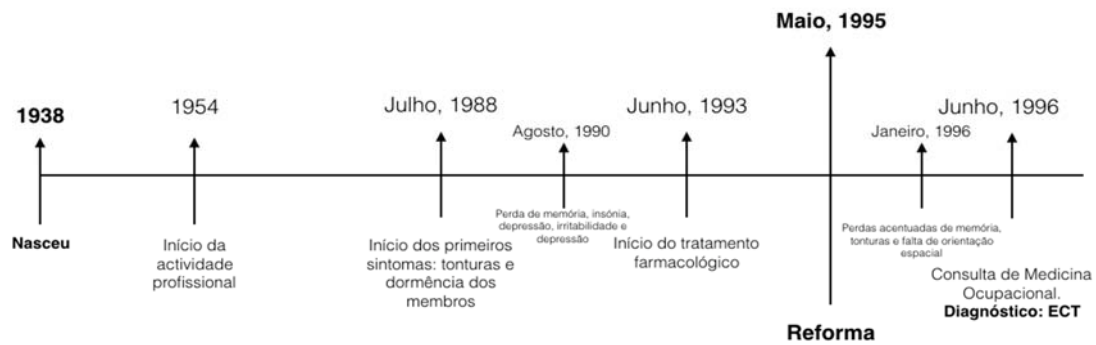


Figura 2.: Linha cronológica de exposição - avaliação e evolução dos sintomas do doente (Adaptado de Feldman, R., et al., 1999).

Desde o final da exposição do doente aos solventes orgânicos e a tintas, este foi submetido a inúmeros exames médicos: testes físicos, que incluíram auscultação, monitorização da tensão arterial, avaliação da capacidade de compreensão oral e escrita, e através de análises de sangue e de urina, foram testados parâmetros bioquímicos, avaliando-se os níveis de ácido hipúrico, metais pesados (mercúrio) e função hepática. Por fim, foi realizada uma ressonância magnética (MRI), cujo resultado imagiológico se encontra na Figura 3.

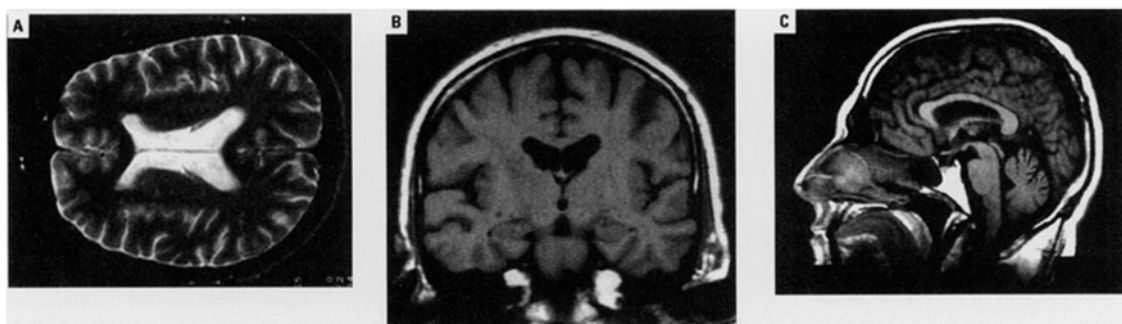


Figura 3.: Ressonância Magnética do doente com Encefalopatia Cerebral Tóxica (ECT). As imagens revelam hipertrofia de substância branca e cinzenta, causada por uma alteração metabólica exógena. As lesões apresentadas, de forma simétrica (característica desta patologia), são irreversíveis e ocorrem após uma exposição muito prolongada a substâncias tóxicas (Feldman, R., et al., 1999).

Quando comparada com uma ressonância magnética de um indivíduo normal (Figura 4), é fácil notar significativas alterações a nível estrutural. É notável a perda simétrica de volume de substância cerebral branca e cinzenta. Este padrão de lesão é, aliás, muito característico deste tipo de patologia que ocorre por alterações metabólicas exógenas, no caso, associada à exposição crónica a solventes orgânicos.

Este doente foi então diagnosticado com uma Encefalopatia Cerebral Tóxica (ECT) - define-se ECT, como a alteração e efeitos ao nível neuro-comportamental dos indivíduos que se encontram expostos a solventes orgânicos e a substâncias neurotóxicas, com manifestações clínicas como as anteriormente descritas (Feldman, R., *et al.*, 1999).

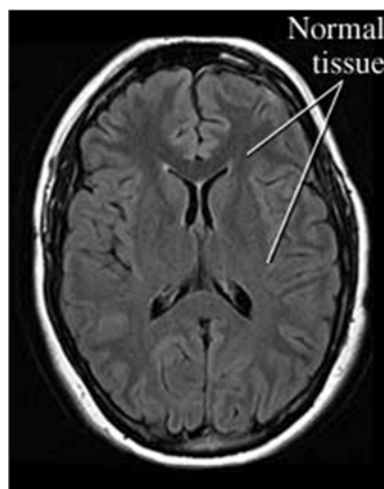


Figura 4.: Ressonância Magnética de indivíduo normal, isto é, sem a presença de qualquer patologia (Feldman, R., *et al.*, 1999).

I.1.5.2 – Caso Clínico 2

Indivíduo do sexo masculino, com 31 anos de idade, admitido nas urgências com um quadro convulsivo e de confusão mental acentuado. Nos últimos 2 meses o doente apresentava sintomas de fadiga, miastenia e dores generalizadas pelo corpo (Chih-Ming, L.; Chi-Kuang, L., *et al.*, 2014).

Em diálogo com a família tomou-se conhecimento de que este era operário numa fábrica de tintas e que trabalhava, não só exposto a estas, como também a outros produtos químicos, num espaço pouco ventilado. O agravamento dos sintomas deu-se após uma semana de trabalho mais intenso, com jornadas diurnas e noturnas, no ambiente descrito.

O doente foi submetido a vários exames neurológicos, os quais confirmaram o estado de confusão do doente, bem como alterações ao nível do SNC.

A ressonância magnética (Figura 5, página 20) a que foi sujeito, revelou lesões simétricas a nível cerebral, com hipersinal da substância branca. Já a análise de urina confirmou a intoxicação por tolueno.

Durante todo o período de internamento o doente manteve ainda o quadro convulsivo, tendo-lhe sido administrado fenitoína IV, um fármaco que pertence à classe dos antiepiléticos e anticonvulsionantes, com o intuito de minimizar e controlar as convulsões. Assim que a condição clínica do doente estabilizou, foi-lhe dado alta médica tendo sido necessário manter um contacto periódico com o hospital para que a sua recuperação pudesse continuar a ser acompanhada e monitorizada com a regularidade necessária até ao seu total restabelecimento (Chih-Ming, L.; Chi-Kuang, L., *et al.*, 2014).

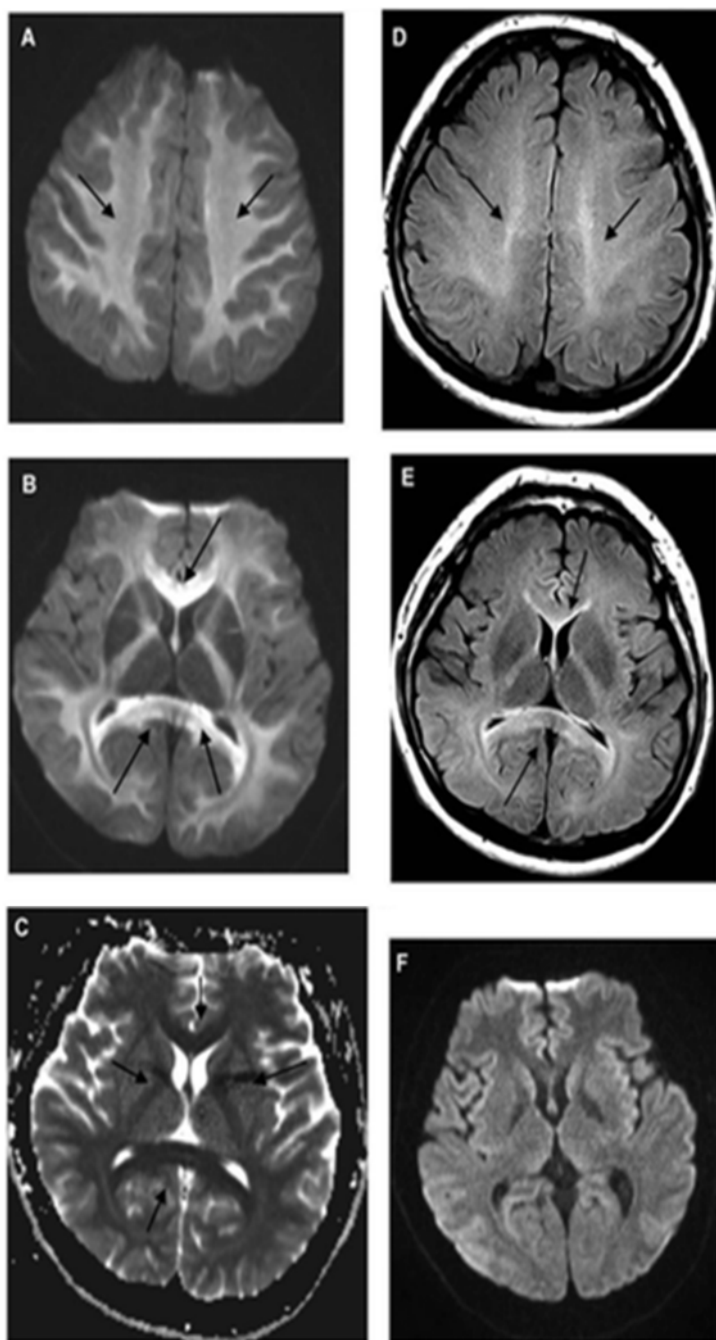


Figura 5.: Ressonância Magnética: as imagens apresentam um padrão de lesões simétricas revelado por um hipersinal da substância branca (regiões brilhantes), característico da patologia em estudo e que revela alterações metabólicas por exposição a uma substância neurotóxica (Chih-Ming, L.; Chi-Kuang, L., *et al.*, 2014).

I.1.5.3 – Caso Clínico 3

Indivíduo com 61 anos de idade (Chih-Ming, L.; Chi-Kuang, L., *et al.*, 2014), do sexo masculino, admitido nas urgências do hospital com um estado de confusão mental bastante avançado. Trabalhador de uma fábrica de tintas e processamento de material, apresentava nos últimos dois meses alterações bruscas de comportamento, falta de orientação no espaço e no tempo e ainda, segundo familiares, várias vezes burlado em restaurantes e mercearias.

Na semana que antecedeu o internamento, o doente apresentava um quadro grave de miastenia com momentos em que não conseguia manter-se em pé.

Tal como nos casos anteriormente descritos, este doente foi de igual forma submetido a testes neurológicos e a um “*Mini-Mental State Examination (MMSE)*” - Mini Exame de Estado Mental – ou teste de *Folstein*. Este consiste num breve questionário com o qual se pretende avaliar o estado mental do doente, rastreando possíveis perdas cognitivas. No caso concreto deste paciente, o teste teve uma baixa pontuação revelando perdas cognitivas acentuadas. O anexo número 2, apresenta um *MMSE* modelo.

A ressonância magnética (MRI), (Figura 6, página 22) revelou uma alteração periventricular bilateral da substância branca do cérebro, com envolvimento e alterações do corpo caloso. O envenenamento causado por agentes químicos foi de imediato admitido como possível diagnóstico. Realizaram-se análises de urina e quando se obtiveram os resultados foi confirmada a intoxicação por tolueno.

Ao doente, foi-lhe administrado uma terapia de hidratação mantendo-se sempre monitorizado até ao momento da alta. Após esta, o acompanhamento manteve-se, tal como no caso anterior, regular (Chih-Ming, L.; Chi-Kuang, L., *et al.*, 2014).

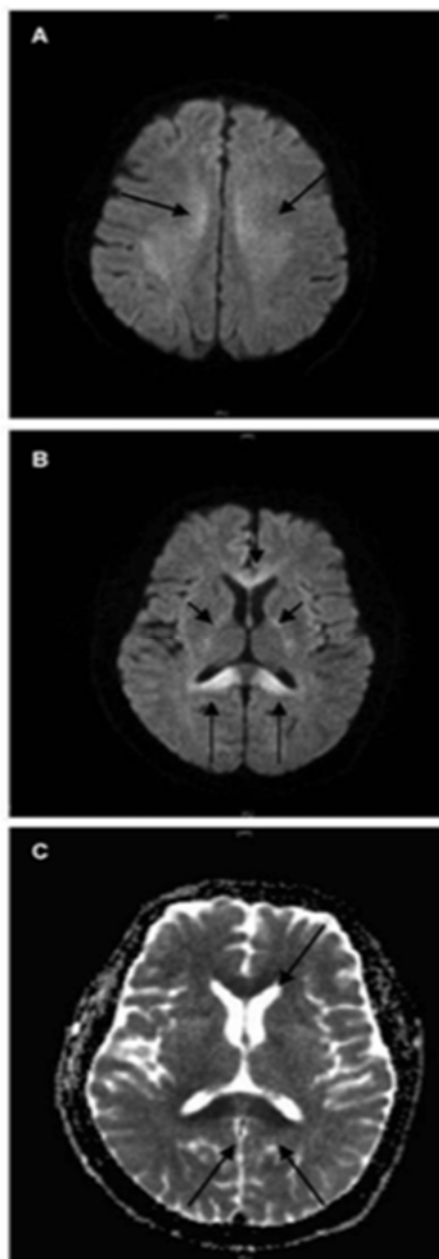


Figura 6.: Ressonância Magnética: (A) e (B) são imagens de difusão e (C) representa um mapa de Coeficiente Aparente de Difusão (ADC). As lesões apresentam-se de forma simétrica e revelam hipersinal da substância branca (zonas brilhantes das imagens A, B e C). Estas modificações imagiológicas indicam, alterações ao nível metabólico, no caso, exógenas, por exposição a uma substância neurotóxica (Chih-Ming, L.; Chi-Kuang, L., *et al.*, 2014).

I.2 - Métodos Analíticos - Protocolo Sequencial

Na literatura disponível sobre estudos semelhantes foi possível compreender que para a determinação de metabolitos em amostras biológicas existe um limitado espectro de escolhas de métodos que permita análises com resultados rigorosos e precisos.

Primeiramente, e tendo então em consideração os textos disponíveis, foi encarada a possibilidade de fazer as análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC).

I.2.1 - High Performance Liquid Chromatography | HPLC

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, consiste numa técnica cromatográfica usada para separar uma mistura de compostos no campo da Química Analítica e Bioquímica, tendo por fim a identificação, quantificação e purificação dos diferentes componentes da mistura (Hassan, B., *et al.* 2012). De uma forma simples e genérica, esta metodologia permite a separação dos diferentes compostos constituintes da amostra, consoante as fases estacionária e móvel, utilizadas. A separação de moléculas ocorre de acordo com a sua estrutura e/ou composição, bem como afinidade para com as fases. Desta forma os componentes que possuam uma ligação mais forte para com a fase estacionária, terão um movimento mais lento ao longo da coluna (Kupiec, T., *et al.*, 2004).

As principais vantagens no recurso a esta técnica, prendem-se com o facto de permitir uma determinação quantitativa das substâncias, assim como diminuir o nível de impurezas e degradação dos compostos em diferentes formulações (Hassan, B., *et al.*, 2012).

Em suma, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência permite determinar a quantidade de um composto específico em solução (Kupiec, T., *et al.*, 2004).

Para desenvolvimento da técnica foi utilizada uma coluna C-18 de fase reversa. O método por HPLC foi, então, desenvolvido e otimizado com recurso a diferentes padrões de ácido hipúrico. Obtiveram-se, para os padrões cromatogramas bem definidos (Figura 7, página 24). No entanto, quando analisadas as primeiras amostras - urinas-teste - para otimização da técnica, o mesmo não se verificou. Este motivo impossibilitou o avanço do estudo por esta metodologia pelo que a técnica acabou por ter que ser abandonada.

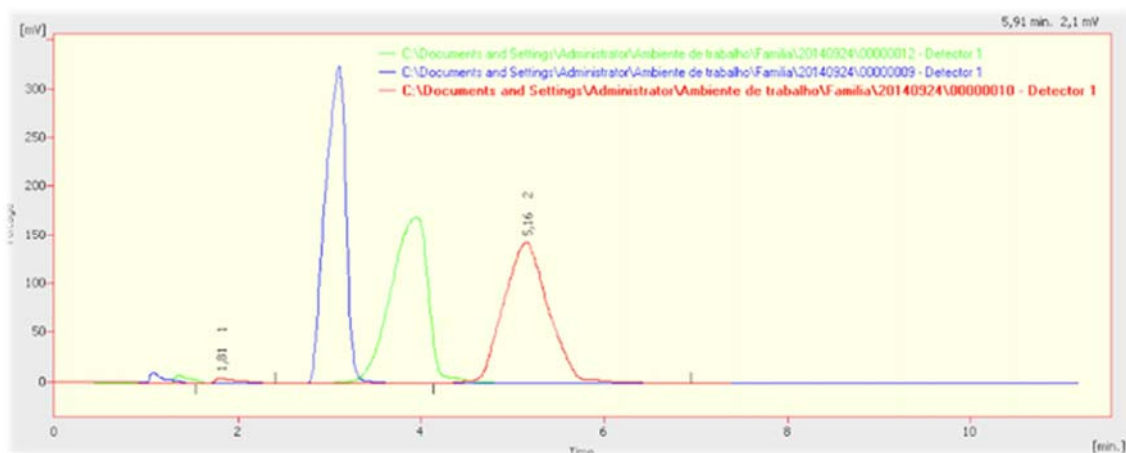


Figura 7.: Otimização da técnica por HPLC. Teste realizado com o padrão de 50 ppm de ácido hipúrico apresentando alteração tempo de retenção devido a variação dos fluxos: 0.6 (vermelho); 0.8 (verde) e 1 mL/min (azul).

I.2.2 - Sequência de procedimentos adotada para tratamento e preparação das amostras:

Rejeitado assim o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, de imediato foi avaliada a possibilidade de executar as análises por **Cromatografia Gasosa com Detetor de Espectrometria de Massa (GC-MS)**, metodologia de eleição nos dias de hoje para a análise de fármacos, drogas, metabolitos destas, entre outras substâncias.

Considerando a elevada sensibilidade desta técnica, a mesma implica a utilização, desenvolvimento e otimização de uma sequência rigorosa de procedimentos para preparação da amostra que se pretende analisar. Nestes procedimentos, incluem-se principalmente, **Solid-Phase Extration** (I.2.2.1) e **Processo de Derivatização** (I.2.2.2), os quais permitem utilizar o método de análise por **GC-MS** (I.2.2.3).

I.2.2.1 - Solid-Phase Extraction | SPE

A *Solid Phase Extration* – SPE, consiste num método de preparação de amostras que utiliza partículas sólidas e material de empacotamento cromatográfico contidos num dispositivo, geralmente um cartucho. Este cartucho permite separar quimicamente os diferentes componentes que constituem uma amostra. Regra geral as amostras encontram-se maioritariamente no estado líquido (embora existam aplicações especiais em que o método pode ser executado com amostras em fase gasosa).

Os cartuchos utilizados foram *Discovery* DSC - 18, com elevada afinidade para o carbono e mecanismo de retenção de **fase reversa**. Estes, retêm a maioria dos compostos orgânicos da solução aquosa. Desta forma é então possível extrair analitos estruturalmente diferentes a partir de uma mesma amostra.

O termo - **fase reversa** - descreve o modo de cromatografia que é precisamente o oposto de **fase normal**, isto é, a utilização de uma fase móvel polar e uma fase estacionária (hidrofóbica), não-polar.

Hoje em dia, além de ser um método facilmente reproduzível, tem uma ampla aplicabilidade. O tipo de cartucho e método utilizados, por fase reversa, representa aproximadamente 60% de todos os métodos de SPE. A maior parte dos protocolos utilizam uma fase móvel composta por uma mistura aquosa com o solvente miscível, orgânico polar, como o acetonitrilo ou o metanol. Isto permite assegurar uma interação adequada entre analitos com a superfície “não-polar” da partícula hidrofóbica.

Uma vez que a **cromatografia de fase reversa** é a técnica mais popular de SPE, é fundamental compreender a melhor forma de acondicionamento do cartucho, de modo a proporcionar a preparação de uma amostra o mais eficientemente possível. Inevitavelmente a amostra irá ter uma elevada variedade de compostos e substâncias, podendo também ter componentes polares e não-polares que podem ser ácidos, bases ou moléculas neutras. Sob condições de fase reversa, o adsorvente será “não-polar” e irá atrair ou reter as moléculas não-polares. No entanto, uma importante ferramenta no desenvolvimento de um método de SPE é o pH. O pH é fundamental no processo de seleção e separação dos solventes.

É importante notar que o pH do tipo de partícula a reter na fase reversa do cartucho, implica sempre um ajuste, não devendo nunca o pH do mesmo ser superior a 8.

A utilização de SPE, apresenta inúmeras vantagens. Entre todas, salientam-se as quatro principais:

1. Simplificação da matriz complexa da amostra e purificação do composto

Um dos maiores problemas para o investigador ocorre quando os compostos de interesse estão contidos numa matriz complexa, como por exemplo resíduos de antibióticos e metabolitos de drogas e fármacos em plasma, soro ou urina. O elevado número de compostos e substâncias que existem na amostra, e a interferência destes na matriz para análise, revela-se um fator extremamente limitativo na execução das análises pretendidas, uma vez que se encontram misturadas com as substâncias de interesse.

Desta forma o primeiro problema a resolver é o da complexidade resultante da própria análise, devido à presença de muitas constituintes que devem ser separados, a fim de identificar e quantificar o composto, ou compostos de interesse.

Outro fator a ter em consideração é o da presença de todas as interferências na matriz da amostra original que podem resultar em tempo de inatividade do aparelho, no caso GC-MS, devido à acumulação da contaminação a cada injeção. Se todas as interferências forem removidas aquando da preparação da amostra, todos os compostos de interesse poderão ser analisados de forma mais simples e eficaz.

Um benefício adicional, ao simplificar a amostra, é melhorar a precisão na identificação e quantificação do composto.

2. Redução do efeito de supressão do ião em aplicações com Espectrómetro de Massa (MS)

O segundo problema, com matrizes complexas, diz respeito ao detetor utilizado, o espectrómetro de massa (LC / MS ou LC / MS / MS).

De forma a se obter uma resposta mais eficiente do sinal MS (com maior sensibilidade), o ião composto deve ser capaz de se formar adequadamente.

Nos casos em que a formação do ião do composto é suprimida por interferências na matriz, a intensidade do sinal é significativamente inferior, diminuindo gradualmente.

Raramente, as interferências podem aumentar artificialmente o sinal reportado do composto. A esta reação, chama-se “*Ion Enhancement*”.

Este processo resulta num aumento impreciso do valor do sinal. O SPE permite minimizar este efeito ao eliminar as interferências a partir do composto, oferecendo assim um resultado mais preciso e rigoroso.

3. Capacidade de fracionar a matriz da amostra permitindo a análise de compostos por classes

A separação dos compostos por classes permitirá uma análise mais rigorosa e aprofundada, permitindo um estudo muito mais eficiente. Por exemplo, admitindo uma análise a um sumo refrigerante que contém uma ampla gama de compostos, os compostos polares podem ser recolhidos como uma fração separada dos compostos não-polares. Estas duas frações poderão então ser analisadas separadamente e de forma muito mais eficiente.

4. Baixo nível de concentração dos compostos

Nos dias de hoje é necessário reportar a análise de amostras que contêm compostos que se encontram em níveis de concentração muito baixos. Tipicamente, estes níveis são mais baixos ainda na amostra pura, excedendo a capacidade de deteção e de sensibilidade dos instrumentos de análise. Um bom exemplo destes casos diz respeito à análise de vestígios de contaminantes em amostras ambientais ou de metabolitos em fluidos biológicos. Mais uma vez, com o recurso ao SPE, é possível aumentar significativamente o sinal e capacidade de deteção mesmo para compostos em concentrações quase vestigiais (Arsenault, J., *et al.*, 2012).

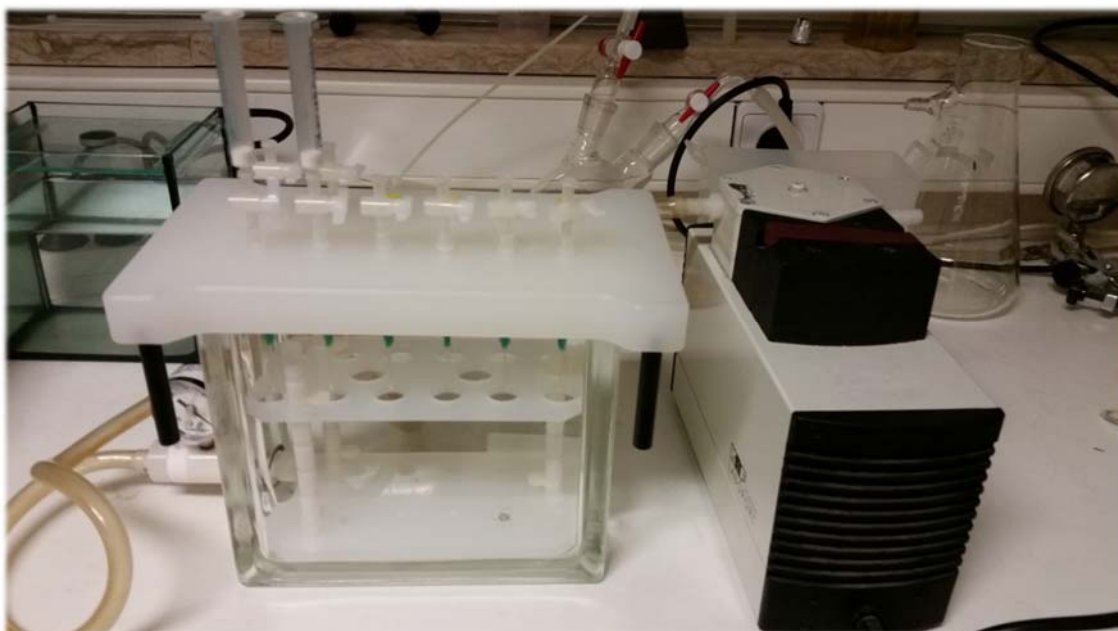


Figura 8.: Fotografia do equipamento de Solid Phase Extraction (SPE) utilizado.

I.2.2.2 - Processo de Derivatização

A derivatização é um método de modificação de estrutura molecular, consistindo na alteração química de um composto, dando-lhe características mais favoráveis para se proceder a uma análise através de um método analítico.

É o caso da Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa (GC-MS) em que é necessário conferir à amostra, quando injetada, maior volatilidade e estabilidade, de modo a que possam ser exibidos picos reprodutíveis com boas áreas, alturas e formas. Assim, este método, além de melhorar a resposta ao composto em análise, melhora também a resolução entre compostos com co-eluição semelhante e picos que se possam encontrar em sobreposição.

No que respeita à escolha do agente derivatizante, este deve garantir que a estrutura química desejada seja reproduzida da forma mais eficiente possível.

Para GC-MS há três tipos básicos de reações de derivatização: Siliciação (*Silylation*), Acetilação (*Acylation*) e Alquilação (*Alkylation*).

Concretamente, para o ácido hipúrico, este foi derivatizado com recurso a um agente de derivatização silicilado, fazendo-se ligar aos hidrogénios ativos do composto, como demonstrado na Figura 9, página 29 (Knapp, D., *et al.*, 1979).

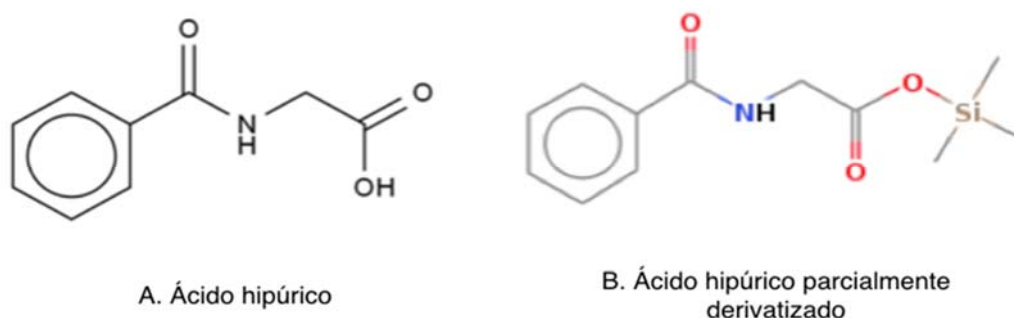


Figura 9.: Derivatização do Ácido Hipúrico: ligação do grupo do Silício ao composto por substituição do grupo H do grupo ácido (adaptado de National Institute of Standards and Technology – NIST).

I.2.3 - Gas Chromatography - Mass Spectrometry | GC-MS

A Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa constitui uma ferramenta importante na identificação e quantificação de substâncias voláteis e semi-voláteis, em misturas complexas. Desta forma é feita a determinação dos pesos moleculares das substâncias que se pretendem conhecer, em misturas de elevada complexidade.

Entre outras aplicações, o GC-MS é mundialmente usado no controlo e análise quantitativa de águas - é o método oficial da *United States Environmental Protection Agency* (EPA-US). É também largamente usado na monitorização de drogas e dos seus metabolitos presentes no sangue e/ou na urina, com fins tanto ao nível de avaliação farmacológica como de avaliação forense. Pode também ser aplicada com a finalidade de descobrir compostos orgânicos desconhecidos, fazendo corresponder e interpretando o seu respetivo espectro de massa (Sigma-Aldrich, Co., 2009).

Para analisar compostos orgânicos por GC-MS é fundamental que estes sejam voláteis e se encontrem em solução. O solvente deve também ele ser orgânico e volátil.

A volatilidade do composto é um dos requisitos fundamentais a ter em consideração para que se possa proceder à análise do mesmo.

Uma das limitações deste método é precisamente o facto de só analisar compostos voláteis. Apenas os compostos com pressões (de vapor) superiores a 10 torr podem ser analisados. Compostos que não cumpram este requisito, e apresentem pressões inferiores têm que ser submetidos a um processo de derivatização.



Figura 10.: Cromatógrafo Gasoso com detetor de Espectrometria de Massa (GC-MS) do Laboratório de Ciências Forenses e Psicológicas Egas Moniz (LCFPPEM).

Seguidamente, no **capítulo Desenvolvimento do Projeto - Métodos**, é apresentado detalhadamente o protocolo sequencial otimizado que permitiu a deteção de ácido hipúrico na urina dos técnicos de manutenção de aeronaves (TMA's) em estudo.

II. Desenvolvimento do Projeto - Métodos

II.1 - Procedimentos Éticos

As estruturas que acolheram e aceitaram colaborar no projeto de investigação foram devidamente informadas sobre a natureza do mesmo, tendo sido apenas aprovada a sua participação após assinatura e reconhecimento de um acordo escrito por parte de das organizações intervenientes, o Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM) e a Base Aérea Nº 6 da Força Aérea Portuguesa, e o ISCSEM e as duas empresas sediadas em Cascais – Tires.

A todos os participantes voluntários foram prestados esclarecimentos sobre a essência do estudo, obtidos consentimentos informados e entregues questionários escritos.

A aprovação ética, foi obtida junto da Comissão de Ética do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

II.2 - Amostra Populacional e Obtenção das Amostras

O grupo de estudo considerado, incluiu 25 elementos, todos do sexo masculino e com idade média de 40,6 anos. A população em estudo, ou seja, todos técnicos de manutenção de aeronaves (TMA's), provinham de duas organizações distintas - uma privada e uma estatal. Aos trabalhadores voluntários foi entregue um questionário com o qual se pretendia conhecer os anos de profissão, como TMA's, o total de horas semanais de trabalho, hábitos tabágicos, consumo de bebidas alcoólicas e doenças crónicas.

A Tabela 3, página 33, apresenta a avaliação dos dados recolhidos através dos inquéritos. As amostras foram recolhidas, por um período total de 8 semanas, em dois momentos distintos: início da jornada de trabalho – segunda-feira, às 8 horas da manhã - e fim da jornada de trabalho – sexta-feira, às 18 horas. Pretendeu-se avaliar e comparar os valores de ácido hipúrico, após um fim-de-semana de descanso, sem exposição a qualquer solvente, procedendo-se à primeira recolha à Segunda-feira de manhã, antes do início da exposição ao tolueno e a segunda recolha, à Sexta-feira, após o dia de trabalho, com o fim de observar o efeito cumulativo da substância no final de cada semana de trabalho.

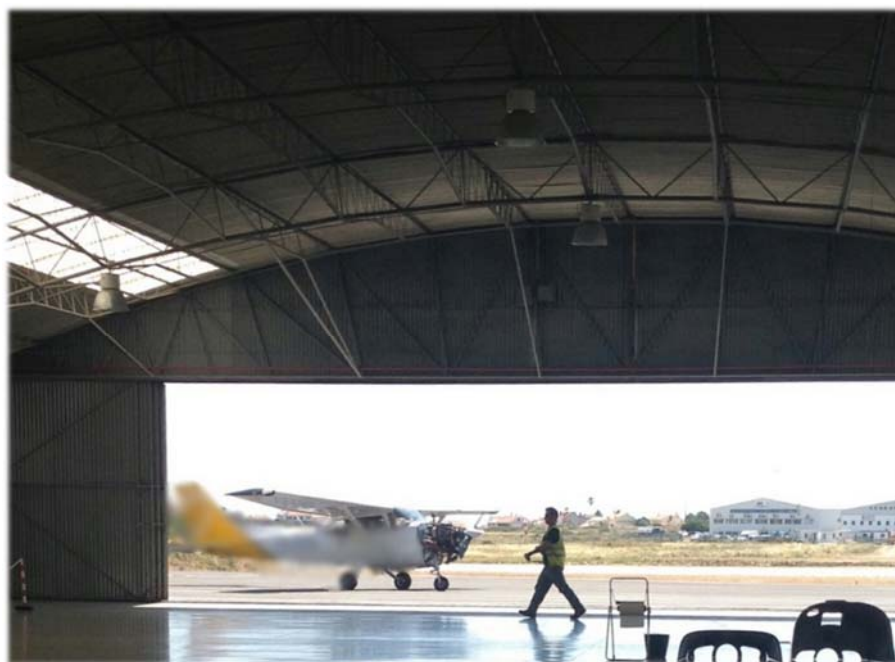


Figura 11.: Fotografia de um dos Hangar onde se realizava a manutenção das aeronaves.

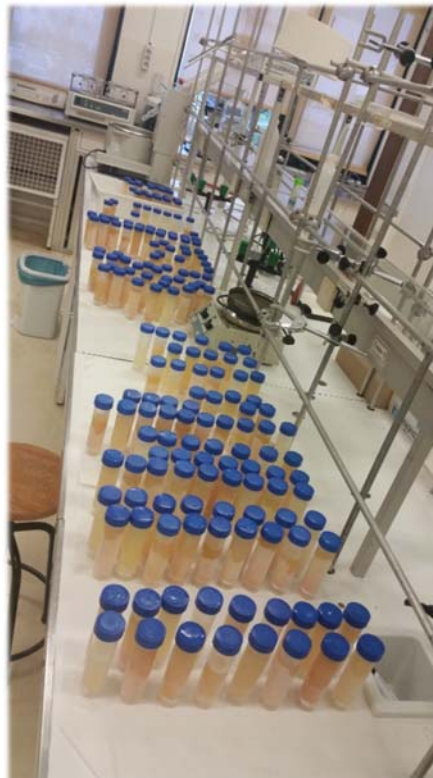


Figura 12.: Fotografia de um dos recipientes de tolueno utilizados pelos trabalhadores para a limpeza das estruturas das aeronaves.

Tabela 3.: Síntese dos dados recolhidos da população amostral (organizações privadas e estatal), com base na avaliação dos inquéritos entregues.

Número de Elementos	25
Idade Média	40, 6 anos
IMC Médio	26,65
Hábitos Tabágicos	Sim
Consumo de Álcool	Sim
Horas de Trabalho Semanal	40 horas
Anos de Exposição (anos de exercício da actividade)	> 25 anos
Doenças Crónicas *	Não

Doenças Crónicas: No universo dos 25 elementos, 9 apresentavam hipertensão arterial e/ou doença cardiovascular e 4 Diabetes Mellitus Tipo 2. Este parâmetro não foi, ao momento da análise da amostra, considerado um fator relevante para exclusão de sujeitos.

**Figura 13.:** Fotografia das amostras de urina recolhidas dos TMA's, já no laboratório.

Concluído todo o processo de recolha de amostras de urina, iniciou-se a primeira etapa do projeto – **Definição de um Protocolo de Otimização da Técnica Analítica** – da qual fez parte o estudo dos métodos enquadrados no capítulo anterior, os quais serão apresentados detalhadamente em seguida, considerando as condições aplicadas a cada um destes.

De salientar que durante todo o período de recolhas, as amostras eram armazenadas e congeladas (assim que chegavam ao laboratório), tendo sido mantidas a uma temperatura de- 20°C até à sua preparação e análise por GC-MS.

As primeiras amostras brancas, utilizadas como controlos para otimização do método, foram tratadas seguindo um processo de centrifugação, durante 10 minutos a 3500 rpm. Posteriormente, todas as amostras foram submetidas a esta técnica e divididas em dois grupos distintos de forma a poderem ser submetidas às análises e procedimentos analíticos definidos.

II. 3 – Desenvolvimento do Trabalho Analítico

II.3.1 - High performance Liquid Chromatography - HPLC

O doseamento do metabolito em análise, como já anteriormente referido, pode ser feito através de diferentes técnicas, entre as quais, as previamente descritas no **capítulo Enquadramento do Projeto**, por HPLC e GC-MS.

De forma a otimizar a pesquisa do ácido hipúrico, e tendo por fim a obtenção de valores com maior precisão e rigor, foram testados diferentes protocolos para cada uma das técnicas referidas.

Para *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), com detetor UV, foi seguido o protocolo descrito por Ogata *et al.*, (1987) e Burgáz *et al.*, (2001).

Quando, foram encontradas as condições ideais de trabalho com o padrão, procedeu-se à avaliação do método com urinas controlo assim como, com urinas controlo contaminadas intencionalmente com ácido hipúrico.

Sendo a urina uma amostra biológica que contém diferentes metabolitos resultantes da biotransformação de diversas substâncias, o método por HPLC, como anteriormente visto no capítulo **Enquadramento do Projeto** e subcapítulo **Métodos Analíticos – Protocolo Sequencial**, acabou assim, por ter que ser abandonado.

II.3.2 - Preparação e Tratamento das Amostras

Com o intuito de garantir uma extração eficiente do ácido hipúrico de modo a obter uma melhor quantificação do mesmo, aquando da pesquisa do metabolito por GC-MS, procedeu-se à realização da técnica de “*Solid Phase Extraction*” (SPE), após um ajuste de pH das amostras a 2.0, com uma solução de HCl a 0.1M, e adição de 50µL de **ácido 4-hidroxi-hipúrico**, padrão interno (IS) escolhido, nas seguintes condições:

Tabela 4: Protocolo de SPE aplicado, com recurso a cartuchos DSC-18 de fase reversa.

Acondicionamento	6 mL metanol + 6 mL água
“ <i>Load</i> ”	Amostra
carregamento da amostra	
Vácuo	10 minutos
Eluição	5 mL acetona
Vácuo	10 minutos

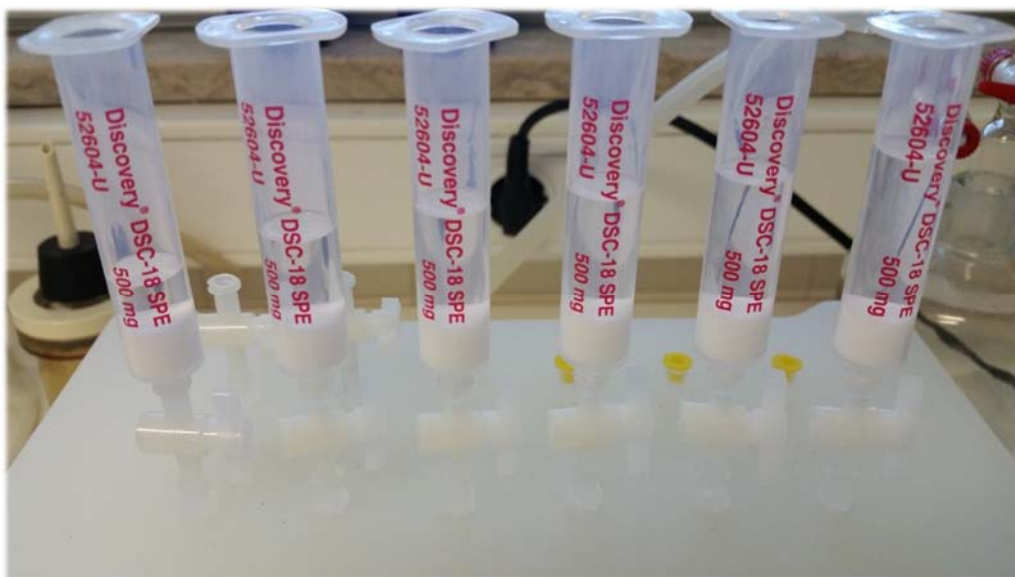


Figura 14.: Fotografia dos cartuchos utilizados para a realização de SPE.

II.3.3 - Processo de Derivatização

Seguidamente, e de forma a conferir à molécula características ainda mais favoráveis para GC-MS, sujeitaram-se as amostras a um processo de derivatização. Esta técnica confere à molécula maior estabilidade e volatilidade, como já referido no capítulo anterior.

Recorreu-se à utilização de um agente de derivatização salicilado, **MSTFA: *N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)-Trifluoroacetamide***, que por substituição do grupo OH, permite a ligação do grupo Si ao ácido hipúrico. O protocolo seguiu sequencialmente as seguintes condições: da amostra anteriormente sujeita a SPE, foram retirados 50 μ L aos quais se adicionaram **65 μ L de agente derivatizante**. Seguidamente, a mistura foi colocada a secar em azoto, levando um tempo médio entre 15 a 20 min e finalmente levada a derivatizar por um período rigorosamente cronometrado de **10 minutos a 50°C**. A amostra ficou assim pronta para ser injetada no GC-MS.

No decorrer do processo, foram testados diferentes tempos e temperaturas de derivatização de forma a perceber se existiriam oscilações ao nível do tempo de retenção da molécula, nos resultados.

II.3.4 - Condições de Gas Chromatography Mass Spectrometry GC-MS

O protocolo seguido e aplicado baseou-se no método utilizado por Sándor Szűcs, *et al.*, (2002), num estudo realizado por este de condições semelhantes.

A otimização do método, utilizando o equipamento de GC-MS (para posterior execução das análises, foi feita sob os seguintes parâmetros:

Tabela 5.: Parâmetros de calibração do equipamento GC-MS⁽¹⁾ ao método a aplicar

Gás	Hélio
Quantidade de Injeção	1 µL de amostra
Temperatura do Injetor	260° C
Temperatura de Interface	280° C
Temperatura da Fonte de Iões	230° C
Temperatura do Quadrupolo	150° C
Energia de Ionização	70 eV
Atraso do Solvente	5.0 minutos

(1). Equipamento de GC-MS utilizado: Agilent Technologies: 6890N GC System 5973N Mass Selective Detector, 7683N Series Injector. Coluna Mega 5 MS: espessura – 0,25µm; diâmetro interno – 0,25mm; comprimento – 30m; temperatura de trabalho – 330°-350°C.

Tabela 6.: Gama de temperaturas aplicadas ao forno (*Oven Ramps*) – Esquema das temperaturas e respetivos intervalos de tempo.

Temperatura (°C)	Tempo (min)
50	0.5
170	3
	(40°/ min)
250	8
	(10°/ min)
300	1
	(50°/ min)

Uma vez concluído todo o processo de otimização da técnica, foram iniciadas as análises às urinas dos TMA's. Relativamente ao grupo amostral da empresa privada, a execução das análises não pôde ser concluída, já que diferentes fatores levaram a que a amostra considerada não pudesse ser submetida para o estudo:

1) O Índice de Massa Corporal (IMC) médio dos trabalhadores, encontrava-se acima dos valores referenciados pela Associação Portuguesa dos Dietistas, seguidamente apresentados na Tabela 7. O IMC médio registado para estes trabalhadores foi de 29,76. Sendo o tolueno uma substância lipofílica, esta terá maior afinidade para o tecido adiposo, tornando o seu o tempo de retenção no organismo superior, quando comparado com os dos outros elementos da amostra em estudo. Este facto, levou a que as únicas análises incluídas no estudo fossem as da empresa estatal, cujo IMC médio registado foi de 23,54.

O IMC, permite estabelecer uma relação entre a massa corporal e a altura do indivíduo. De acordo com a Associação Portuguesa dos Dietistas, este valor é obtido, através da razão entre o peso (kg) e o quadrado da altura (m):

$$\frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Altura(m)}^2}$$

Tabela 7.: Classificação da Associação Portuguesa dos Dietistas, que permite distribuir e agrupar os indivíduos, com idade superior a 20 anos, tendo em consideração o resultado obtido.

Classificação Adultos	IMC (kg/m ²)
Baixo Peso	<18
Eutrofia	18,5 – 24,9
Pré-Obesidade	25 – 29,9
Obesidade, grau I	30 – 34,9
Obesidade, grau II	35 – 39,9
Obesidade mórbida	> 40

2) Adicionalmente, o **Padrão Interno** (IS) selecionado e aplicado, para o qual o método foi otimizado, é metabolito do ácido acetilsalicílico. Motivo que necessariamente obrigou a que as amostras recolhidas junto da empresa privada, não pudessem ser validadas, uma vez que nove (dos 14) destes técnicos se encontravam medicados com Aspirina (ácido acetilsalicílico), por sofrerem de doença cardiovascular.

De salientar que das amostras sujeitas a análise, as da organização estatal, apenas dois dos 11 indivíduos voluntários participantes foram rejeitados, por apresentarem uma participação inferior a 7 dias, nos dias de colheita.

III. Apresentação de Resultados

III.1- Resultados ETAPA 1

III.1.1 – Otimização do Método

Os primeiros resultados apresentados, relativos à etapa I do estudo, dizem respeito à fase de definição e otimização do protocolo sequencial de métodos analíticos a aplicar. De salientar que estes resultados correspondem apenas a uma **análise qualitativa**.

Durante o processo de otimização do método há a referir que, ao nível da técnica de derivatização, as amostras testadas foram submetidas a diferentes variações, nomeadamente de **tempo**, **concentração** e **temperatura**. Pretendia-se observar se existiam alterações positivas ao nível do tempo de retenção e das áreas obtidas para o ácido hipúrico. As soluções metanólicas de ácido hipúrico e padrão interno (IS), foram preparadas nas concentrações de **5, 20 e 30 ppm** para **HA** e **40 ppm** para **IS**.

Quando iniciadas as corridas em GC-MS, estas foram executadas em modo **SIM** e modo **SCAN**. O modo SIM, permite a monitorização dos iões específicos da molécula em estudo, ácido hipúrico silicilado, enquanto o modo SCAN, possibilita a varredura dos fragmentos iónicos a partir da qual se obtém o espectro da referida molécula. Quando se procede a esta análise, com base nos pesos moleculares dos fragmentos iónicos obtidos, fornecida pelo *software* do programa de análise do GC-MS (NIST, 2011), é-nos indicado que estes valores correspondem aos fragmentos de uma molécula parcialmente derivatizada (como se apresenta nas Figuras 15 e 16 na página 41).

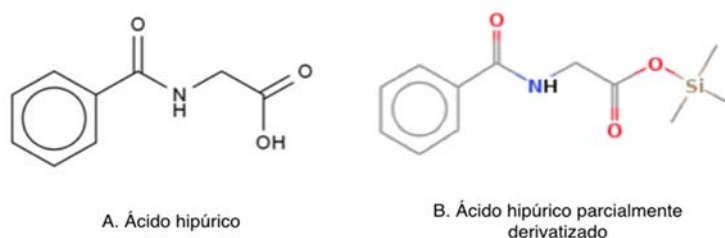


Figura 15.: Molécula de ácido hipúrico (A) e molécula de ácido hipúrico parcialmente derivatizada (B).

A derivatização seria completa se ocorresse nos dois protões disponíveis – protão do NH e do OH do grupo ácido (NIST, 2011).

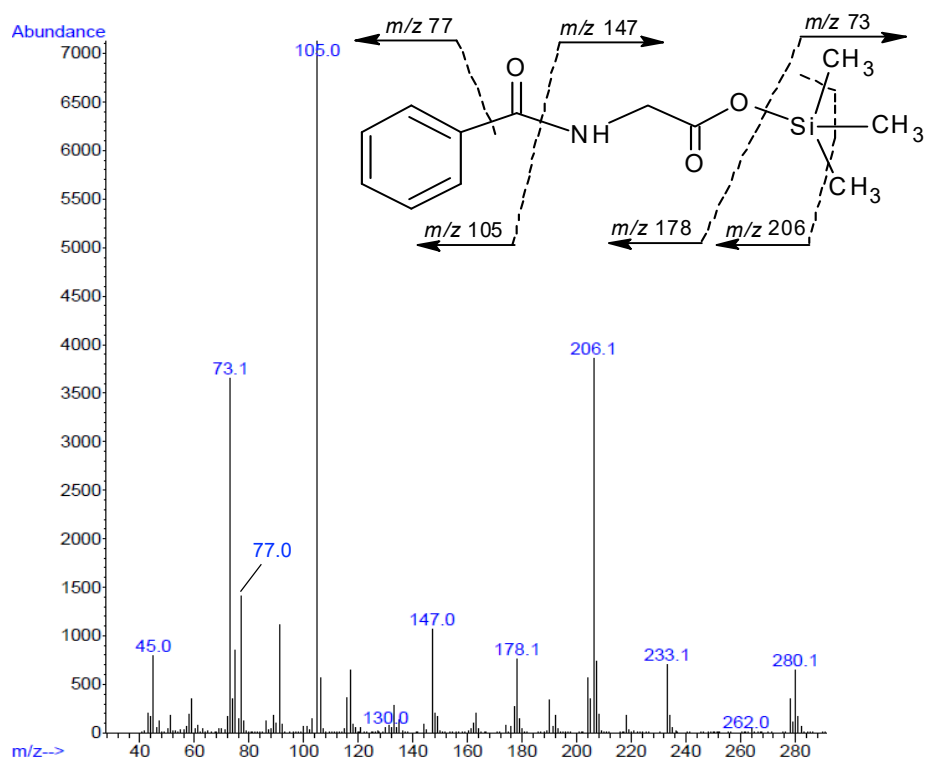


Figura 16.: Espectro de massa do ácido hipúrico conseguido através da fragmentação da molécula e respetivos fragmentos obtidos a partir dos padrões e das urinas, confirmados pela biblioteca NIST, 2011.

Após a fase inicial de otimização da técnica com padrões e urinas controlo, foi testada pela primeira vez, uma urina de um dos técnicos de manutenção de aeronaves (TMA's) da Força Aérea Portuguesa.

Numa primeira análise, (Figura 17, página 42) ocorreu apenas uma derivatização parcial da molécula, tendo o IS sido visível apenas em modo SCAN. Os tempos de retenção registados para a amostra testada para o ácido hipúrico e padrão interno (IS) foram respetivamente: 8,964 minutos e 10,868 minutos.

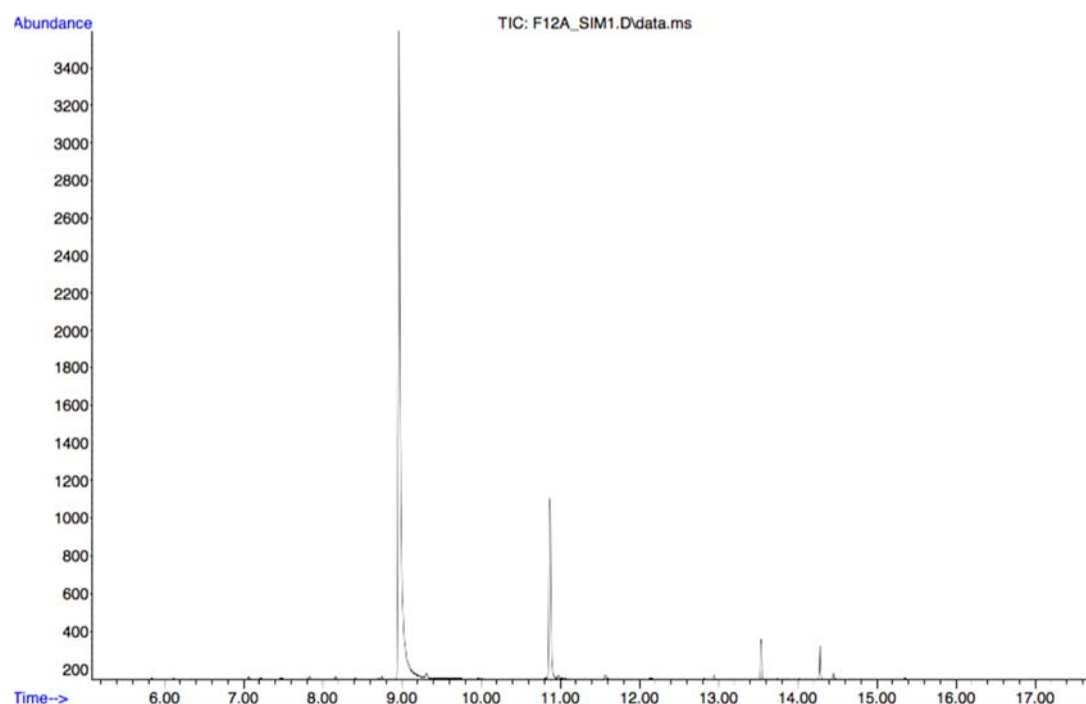


Figura 17.: Cromatograma obtido em modo SIM, referente à primeira análise de uma urina (de um trabalhador da Força Aérea Portuguesa), segundo as condições otimizadas para o método em estudo. Os tempos de retenção dos picos registados neste cromatograma são, para o ácido hipúrico (HA) e padrão interno (IS), respetivamente: 8, 964 minutos e 10, 868 minutos.

O facto de apenas ocorrer derivatização parcial de HA foi atribuído à possibilidade de o agente derivatizante se encontrar adulterado, uma vez que em modo SCAN se verificou existirem contaminações de outros fragmentos pertencentes a outras moléculas.

Foram então executadas novas análises à urina do mesmo sujeito, com um agente derivatizante adquirido para o efeito. Os resultados apresentam-se, no cromatograma correspondente à **Figura 18.**:

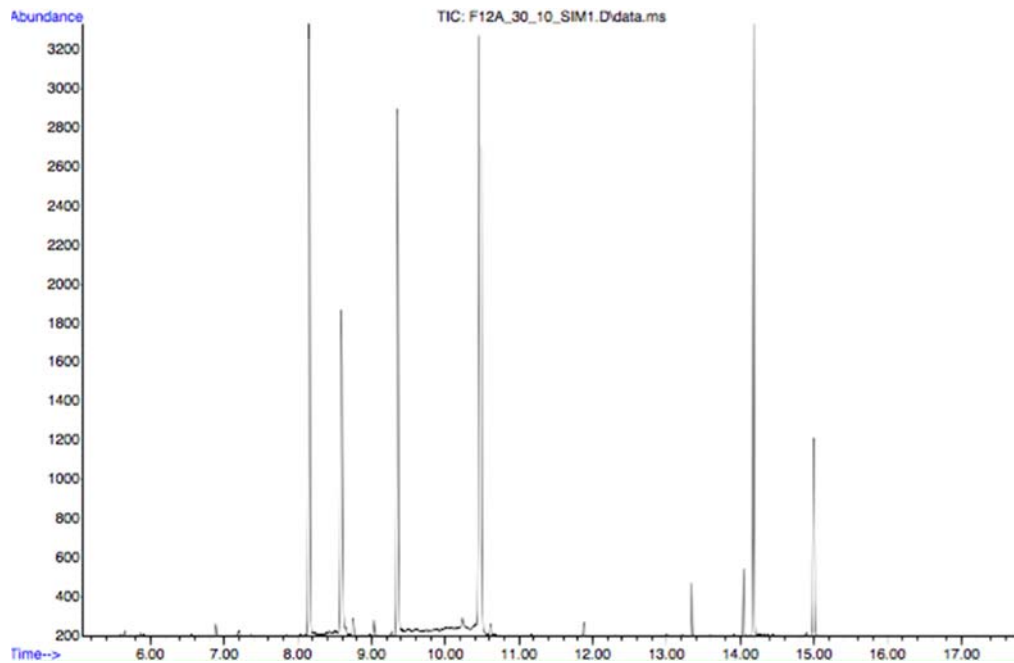


Figura 18.: Cromatograma referente à repetição da análise da urina (do mesmo trabalhador da Força Aérea Portuguesa, apresentado na Figura 17) após utilização do novo agente derivatizante. Os tempos de retenção registados com derivatização completa (DP) de HA e IS, foram respetivamente 8,152 minutos e 9,351 minutos.

III.2 - Resultados ETAPA II

III.2. 1 - Análise e tratamento das Amostras

Os resultados obtidos na etapa II do projeto, incidem sobre os dados e valores obtidos após a definição do protocolo sequencial a aplicar, bem como na escolha e análise das urinas a estudar.

As amostras passíveis de análise, foram escolhidas não só com base na frequência de participação dos sujeitos, mas também segundo critérios anteriormente referidos que tiveram em consideração o peso e a história clínica – medicação – dos TMA's. De salientar, que no que diz respeito à frequência de participação, todos os indivíduos com uma assiduidade inferior a 7 dias foram automaticamente excluídos do estudo por não apresentarem uma amostra relevante, que permitisse uma correta e mais precisa avaliação do seu nível de exposição.

A curva de calibração obtida para análise quantitativa de HA, por GC-MS, foi calculada com base nas áreas dos cromatogramas das soluções padrão. As concentrações fizeram-se variar entre zero e 100 ppm de ácido hipúrico. Todas as soluções padrão foram analisadas em triplicado. Os resultados obtidos através deste cromatograma permitiram igualmente estudar a linearidade do método, de modo a controlar a estabilidade das condições analíticas, já que as soluções padrão (no mínimo três e diariamente), eram sempre incluídas durante as análises às urinas realizadas por GC-MS.

Uma vez otimizadas as condições, obteve-se a curva de calibração seguidamente apresentada na Figura 19, página 45. Esta apresenta um ajuste linear na gama de concentrações de zero a 100 ppm, como acima referido.

No momento da análise dos resultados, os valores de concentração inicialmente alcançados por dia e por indivíduo, foram estudados tendo em conta os dias de colheita. Posteriormente, a análise destas concentrações foi realizada através da obtenção da média em todas as segundas-feiras e todas as sextas-feiras para cada indivíduo, com o intuito de avaliar a evolução da exposição de cada um dos sujeitos no período das 8 semanas (Figura 20, página 45). Simultaneamente, ao cálculo da média, realizou-se do estudo do desvio padrão associado.

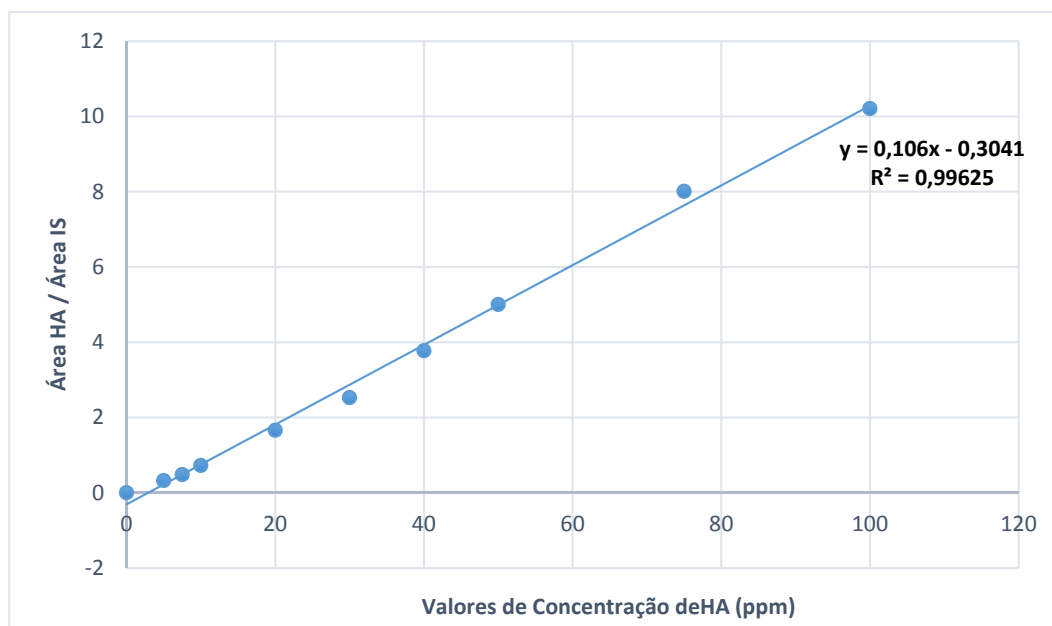


Figura 19.: Curva de calibração obtida por GC-MS para diferentes concentrações: (Área HA/ Área IS) corresponde à razão das áreas dos picos de HA e IS, e HA à concentração das soluções padrão de ácido hipúrico (0 a 100 ppm). O ajuste linear é representado pela reta $Y = 0,106 \cdot X - 0,3041$, com $R^2 = 0,99625$.

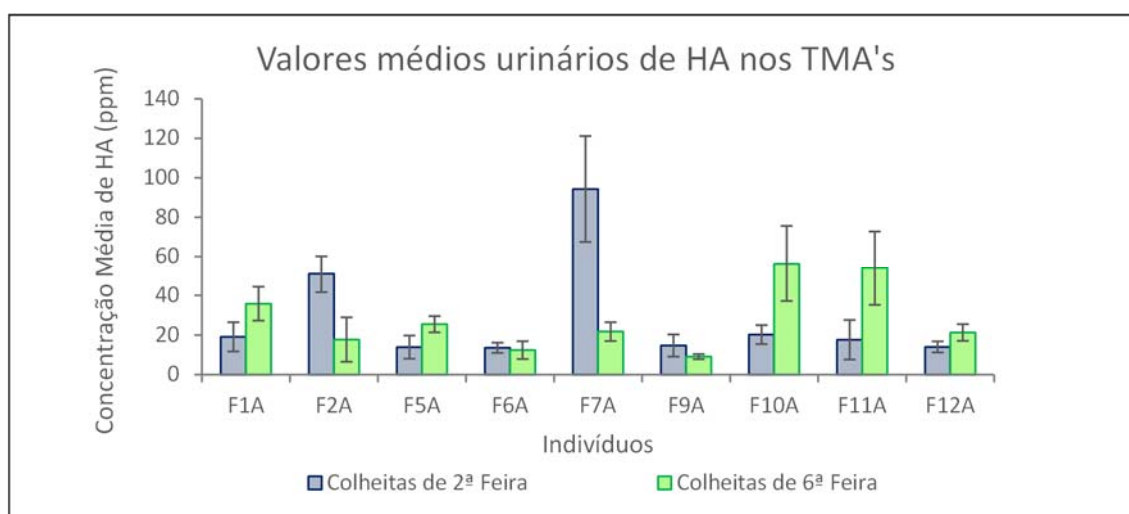


Figura 20.: Valores médios, por indivíduo, das concentrações de HA detetadas na urina, nos dias da semana em que foram realizadas as colheitas. O gráfico representa a média \pm desvio padrão para $n=8$ e $n=7$, segundas e sextas-feiras, respectivamente.

IV. Discussão de Resultados

Este trabalho pretendeu quantificar pela primeira vez o ácido hipúrico, metabolito do tolueno na urina dos trabalhadores técnicos de manutenção de aeronaves da Força Aérea Portuguesa.

A escolha deste metabolito baseou-se na biotransformação do tolueno e nos dados fornecidos pelo ACGHI. Foi investigada a excreção do HA urinário, biomarcador geralmente utilizado por este organismo para avaliação da exposição ao tolueno em toxicologia ocupacional.

A técnica eleita para a quantificação deste biomarcador utiliza o GC-MS. É fundamental salientar que os valores conseguidos, foram consequência de uma série de métodos estudados e posteriormente adotados que permitiram alcançar os resultados obtidos:

- 1) Através da técnica de **SPE**, é possível realizar uma extração eficiente do ácido hipúrico e obter uma melhor quantificação do mesmo, aquando da pesquisa do metabolito por GC-MS;
- 2) A **derivatização** da molécula, confere-lhe características mais favoráveis para seguida utilização do GC-MS. Esta prática, atribui à molécula maior estabilidade e volatilidade;
- 3) A utilização do **padrão interno**, permite-nos igualmente contabilizar e anular qualquer alteração, nomeadamente durante a injeção da amostra. Estas variações podem coexistir com a análise da amostra pela cromatografia gasosa, sendo que a utilização do método padrão interno assegura-nos resultados mais fidedignos. A sua escolha, baseou-se na estrutura molecular e no tempo de retenção apresentado nas condições otimizadas;

- 4) Por fim, a **Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa** é importante na identificação e quantificação de substâncias voláteis e semi-voláteis, em misturas complexas, como é o caso da urina. Através desta técnica, é feita a determinação dos pesos moleculares das substâncias que se pretendem conhecer, em misturas de elevada complexidade.

Nos estudos que tivemos presentes, foram apresentados casos clínicos que afirmam que a exposição crónica a este solvente pode induzir lesões celulares diretas, sobretudo ao nível do Sistema Nervoso Central, inibindo a função dos neurotransmissores, conduzindo posteriormente a um efeito tóxico (Chih-Ming, L.; Chi-Kuang, L., 2014).

O presente trabalho, que inicialmente encarou a possibilidade de incluir duas organizações, acabou, por razões descritas no capítulo **II. Desenvolvimento do Projeto - Métodos** (Sub-capítulo II.3 – Desenvolvimento do Trabalho Analítico, página 34), por se concentrar em apenas uma organização que reuniu um total de 9 técnicos (participantes voluntários).

A confrontação de resultados, foi então realizada tendo a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGHI) - *Association of Advancing and Environmental Health* (2007), como modelo. O valor limite (TLV) de HA, resultante da exposição ao tolueno é 20 ppm. Esta referência, foi para todos os resultados obtidos tida em consideração, procedendo-se assim à comparação dos níveis de concentração médios, com os desta menção. Ainda assim, globalmente, alguns indivíduos da amostra parecem apresentar valores de concentração, de HA na urina, bastante próximos aos desta referência, Figura 21, página 48.

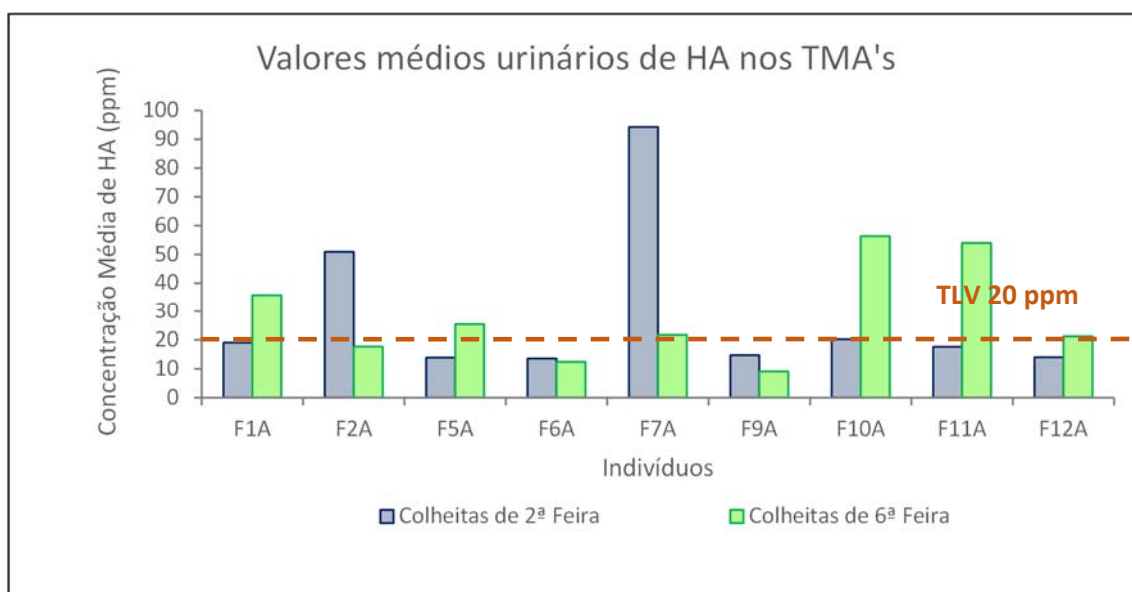


Figura 21.: Representação do limite de exposição ao Tolueno, 20 ppm de HA em urina, estabelecido pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGHI), Association of Advancing and Environmental Health*, 2007.

Pela análise do gráfico (Figura 20, página 45) podemos observar que para os indivíduos F1A, F2A, F5A, F7A, F10A, F11A e F12A, os valores obtidos para HA urinário às segundas-feiras são significativamente diferentes dos valores obtidos para os mesmos indivíduos à sexta-feira. Relativamente aos indivíduos F6A e F9A parecem não existir alterações significativas de HA urinário entre os dois períodos de colheita.

Podemos deduzir também, que os indivíduos F1A, F5A, F10A, F11A e F12A, sofrem de uma acumulação de tolueno e/ou ácido hipúrico no organismo de segunda, para sexta-feira uma vez que os valores médios de HA aumentam de forma significativa. Já nos indivíduos F2A, F7A e F9A, verifica-se uma diminuição dos níveis de HA de segunda para sexta-feira.

Observando o regime de trabalho (Tabela 8, página 49) da oficina de manutenção de aeronáutica selecionada para o estudo, parece possível concluir que existe, de facto, um efeito cumulativo de tolueno como resultado de uma exposição continuada ao mesmo, detetado através da presença de valores significativamente diferentes de ácido hipúrico na urina, entre as amostras de segunda e sexta-feira.

Tabela 8.: Regímen de trabalho dos TMA's da Força Aérea Portuguesa entre o período de Setembro e Dezembro.

Regímen de Trabalho	
Plano de Folgas	
Durante a Semana	Fim de Semana
(entre 3 ^a e 5 ^a)	(Sábado a Domingo)
F2A	F1A
F7A	F5A
F9A	F6A
-	F10A
-	F11A
-	F12A

A confrontação do plano de trabalho com os resultados obtidos para os valores médios urinários de HA, permite-nos concluir que há acumulação durante as jornadas de trabalho dos TMA's, sendo necessário um interregno na exposição a este solvente neurotóxico para que ocorra diminuição nos valores médios urinários de ácido hipúrico.

V. Conclusão

A execução do presente estudo, primeiro desta natureza realizado em Portugal, teve em vista proceder à deteção de ácido hipúrico em amostras de urina de técnicos de manutenção de aeronaves, em resultado da continuada exposição ao tolueno, naquele que é o seu ambiente de trabalho.

Através da sua realização podemos concluir que a deteção de ácido hipúrico na urina e a variação da sua concentração, parece estar diretamente relacionada com o número de dias e horas de exposição ao tolueno. Parecendo-nos por isso, seguro afirmar que de acordo com o régimen de trabalho que nos foi apresentado, poderá existir um efeito cumulativo aquando da exposição continuada a este solvente orgânico.

Espera-se, então que realização deste estudo, em seguimento de outros já publicados, facilite o diagnóstico clínico de eventual intoxicação por solventes orgânicos, bem como alerte as instituições e médicos de primeira linha em contacto com estes grupos de trabalhadores, minimizando a sua exposição e aperfeiçoando as suas condições de trabalho.

A técnica eleita permite-nos obter especificidade nas análises realizadas para deteção do ácido hipúrico. Após esta deteção nas amostras estudadas pretendemos ainda validar o procedimento analítico de acordo com *International Conference on Harmonization* (ICH), conferindo a este trabalho um maior fundamento científico.

VI. Referências Bibliográficas

Arsenault, J. (2012). Beginner's guide to SPE – Solid Phase Extraction. Water Corporation, Milford, MA 01757, USA.

Artur, L.; Anderson L. (2012). Determinação de ácido hipúrico, metil hipúrico e fenilglioxílico em urina. HPLC PerkinElmer/HP.

Association of Advancing and Environmental Health – American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Threshold Limit Values. (2007). Consultado em Fevereiro, 2017.

Burgaz, S.; Erdem, O.; Çakmak G.; Erdem, N.; Karakaya A.; Esat-Karakaya, A. (2001). Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. Department of Toxicology, Faculty of Pharmac, Gazi University, 06330, Hipodrom, Ankara, Turkey.

Chih-Ming Lin, MD, MPH, Chi-Kuang Liu, MD. (2014). Reversible cerebral periventricular white matter changes with Corpus Callosum involvement in acute toluene- poisoning. Department of Neurology, Stroke Center, Chunghua Christian Hospital, Chunghua City, Taiwan. Department of Neuro-imaging, Chunghua Christian Hospital, Chunghua City, Taiwan.

Errebo-Knudsen, E.; Olsen, F. (1985). Organic Solvents and presenile dementia (The Painter's Syndrome). A critical review of the Danish Literature. Institute of Hygiene and the Budde Laboratorium, University of Copenhagen, Blegdamsvej 21, 2100 Copenhagen, Denmark.

Feldman, R.; Ratner, M.; Ptak, T. (1999). Chronic toxic encephalopathy in a painter exposed to mixed solvents. Environmental and Occupational Neurology Program, Department of Neurology, Boston University School of Medicine, Boston, USA.

Hassan, B. (2012). HPLC uses and importance in the pharmaceutical analysis and industrial field. Clinical Pharmacy Discipline, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sains Malaysia, Penang, Malaysia.

IPCS (1985), Environmental Health Criteria 52: Toluene, World Health Organization, Geneva.

Kang, S.K.; Rohlman, D.; Lee, M.Y.; Lee, H.S.; Chung, S. Y.; Anger, W. K. (2005). Neurobehavioral performance in workers exposed to toluene. Center of Occupational Diseases Research, Occupational Safety and Health Research Institute, Korea. Republic of Korea.

King, M. (1982). Neurological sequelae of toluene abuse. Royal Hospital for Sick Children, Yorkhill, Glasgow.

Knapp, D. (1979). Handbook of Analytical Derivatization Reactions. Department of Pharmacology, Medical University of South Carolina, South Carolina, USA.

Kupiec, T. (2004). Quality- control analytical methods: High- Performance Liquid Cromatography. Analytical Research Laboratories, Oklahoma City, Oklahoma, USA.

Marchand, A.; Aranda-Rodriguez, R.; Tardif, R.; Nong, A.; Haddad, S. (2015). Human inhalation exposures to toluene, ethylbenzene, and m-xylene and physiologically based pharmacokinetic modeling of exposure biomarkers in exhaled air, blood na urine. Departement of Environmental and Occupational Health, ESPUM, IRSPUM, Chair in Toxicological Risk Assessment and Management, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Ogata, M.; Taguchi T. (1987). Quantitation of urinary metabolites of toluene, xylene styrene, ethylbenzene, benzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. Department of public health, Okayama University Medical School, Okayama, Japan.

O'Leary-Moore, S.K.; Galloway, M.; McMechan, A.; Interkauf, S.; Hanning, J.; Bowen, S. (2009). Neurochemical changes after acute binge toluene inhalation in adolescent and adult rats: A high- resolution magnetic resonance spectroscopy study. Department of Psychology, Wayne State University, Detroit, USA.

Sánchez, O.; Padrón, H.; Andreu, T.; Prego, E.; Jacas, I. (2010). Valores de ácido hipúrico en orina en trabajadores expuestos a tolueno. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba, Cuba.

SCOEL/SUM/18, Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for Toluene, March 2001.

Sigma-Aldrich, Co., (2009). Sigma Aldrich Analytical Basic Techniques Webinar Series. Webinar two – The Basics of Gas Chromatography, USA.

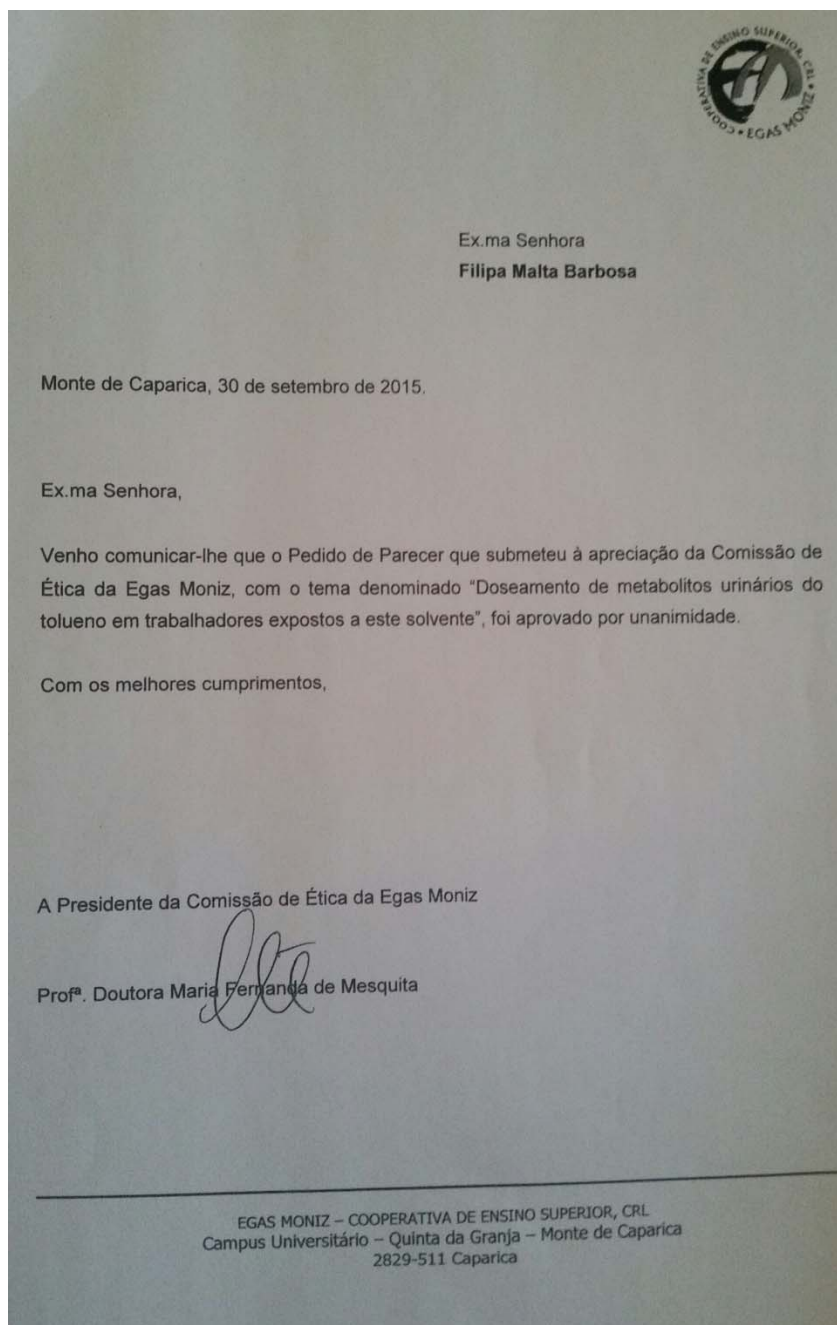
Szúcs, S.; Tóth, L.; Legoza, J., Sárvary, A.; Ádány R. (2002). Simultaneous determination of styrene toluene and xylene metabolites in urine by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. Hungary.

Wartono, M.; Lestari, N. (2015). High toluene exposure risk increases risk of olfactory dysfunction in furniture workers. Department of Anatomy Occupational Health, Faculty of Medicine, Trisakti University, Indonesia.


VII. Anexos

1. Digitalização dos documentos oficiais de autorização para realização do estudo nas organizações eleitas:

A – Autorização da Comissão de Ética do ISCSEM



B – Autorização da Força Aérea Portuguesa para realização das colheitas na Base Aérea número 6, no Montijo.


S. R.
MINISTÉRIO DA DEFESA NACIONAL
FORÇA AÉREA
Gabinete do Chefe de Estado-Maior

Em resposta
Refira: 2015-10-19-011315 P.º 90/15

Para: Exma. Senhora
Filipa Malta Barbosa
filipamaltabarbosa@gmail.com

Assunto: TRABALHO DE INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA

Ref.ª: S/ solicitação de 25 de maio de 2015, 13:38.
EXMA. SEN. FILIPA BARBOSA

Relativamente ao assunto em epígrafe, encarrega-me S. Ex.ª o Chefe do Estado-Maior da Força Aérea, em exercício de funções, de comunicar a V. Ex.ª que, no âmbito da solicitação em referência, é com satisfação que a Força Aérea regista o seu pedido de colaboração para a realização do trabalho de investigação na nossa Organização.

Mais me encarrega S. Ex.ª o Chefe de Estado-Maior da Força Aérea, em exercício de funções, de informar V. Ex.ª que a Base Aérea N.º 6 (BA6) está disponível para colaborar tal como solicitado. Para o efeito deverá ser assinada uma Carta de Acordo, relativa à colaboração com o Trabalho de Investigação Científica, tendo ainda que apresentar um termo de responsabilidade assinado pela proponente e também uma cópia da apólice de seguro de acidentes pessoais.

A assinatura da Carta de Acordo relativa ao trabalho de investigação científica é delegada no Diretor da Direção de Instrução, Brigadeiro-General Piloto-Aviador Henrique Ferreira Lopes.

A coordenação das atividades a efetuar é da responsabilidade da BA6. Para o efeito o elemento de ligação da entidade de acolhimento é a Major Olívia Souza, E-mail: ofsouza@emfa.pt, telefone: 212 328 545.

Com os melhores cumprimentos *e consideração*
P O CHEFE DO GABINETE
7

Joaquim Fernando Soares de Almeida
Major-General Piloto Aviador
D. Gomes
Corp. P. VAV

Em Anexo:
- Carta de Acordo e termo de responsabilidade

Av. Leite de Vasconcelos • Alfragide • 2614-506 Amadora • PORTUGAL • Tel. 214712095 • Fax 214713237

C – Autorizações das organizações privadas do Aeródromo Municipal de Cascais: Aviometa e Helisuporte, respetivamente.

IS INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

Pedido de Autorização - Recolha de Dados
Código | IMP.EM.EI.07_02

Curso	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas	Ano Letivo	2015/2016
Unidade Curricular	Iniciação à Investigação Científica	Ano / Semestre	5º ano, 1º semestre
Estudante(s)	Filipa Malta Barbosa		
Docente responsável	Maria Edite da Silva Oliveira Torres		
Contactos	email	Edite.torres@netcabo.pt	Telefone 918230757
Local de recolha de dados	AVIOMETA		
Morada	Aeródromo Municipal de Cascais, Hangar 2, Portaria sul		
Período de recolha	Setembro, Outubro		
Objetivo(s) da investigação	1) Desenvolvimento de um estudo em Toxicologia Ocupacional, através do doseamento de metabolitos do composto tolueno, em urinas de técnicos e auxiliares de manutenção de aeronaves. 2) Comparar os níveis urinários dos trabalhadores com os valores legislados aplicados em Portugal. 3) Avaliar o impacto da exposição na saúde dos trabalhadores.		
Resumo do projeto ⁽¹⁾	O tolueno é um composto que se encontra maioritariamente presente em colas, combustíveis, tintas e produtos de limpeza. Deste modo, pretende-se dosear os metabolitos deste composto em urinas de trabalhadores de oficinas de manutenção de aeronaves.		
Metodologia de recolha de dados	1) A recolha de urinas dos trabalhadores deverá ser feita durante os meses de setembro e outubro de 2015. 2) Durante o mês de setembro far-se-á a recolha de urina à 2ª e à 6ª feira: recolha feita imediatamente antes e após as 8 horas de trabalho. 3) Será feito um estudo idêntico, durante o mês de outubro, mas com recolha de urina a 3 dias da semana (2ª, 4ª e 6ª feiras).		
Assinatura do docente ⁽²⁾	Maria Edite S.O. Torres	Data	23.6.2015
Espaço reservado à Direção do ISCSEM			
Decisão	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Direção do ISCSEM ⁽³⁾		Data	23.6.2015
Espaço reservado à Entidade a quem é enviado o pedido de autorização			
Decisão	<input checked="" type="checkbox"/> Autorizada a recolha de dados <input type="checkbox"/> Não autorizada a recolha de dados		
Confidencialidade	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Responsável ⁽⁴⁾	Clara Ferreira	Data	8/07/2015

Pedido de Autorização - Recolha de Dados

Código | IMP.EM.EI.07_02

Curso	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas	Ano Letivo	2015/2016
Unidade Curricular	Iniciação à Investigação Científica	Ano / Semestre	5º ano, 1º semestre
Estudante(s)	Filipa Malta Barbosa		

Docente responsável	Maria Edite da Silva Oliveira Torres		
Contactos	email	Edite.torres@netcabo.pt	Telefone 918230757

Local de recolha de dados	Helisuporte
Morada	Aeródromo Municipal de Cascais, Hangar 3, Portaria sul
Período de recolha	Setembro, Outubro
Objetivo(s) da investigação	1) Desenvolvimento de um estudo em Toxicologia Ocupacional, através do doseamento de metabolitos do composto tolueno, em urinas de técnicos e auxiliares de manutenção de aeronaves. 2) Comparar os níveis urinários dos trabalhadores com os valores legislados aplicados em Portugal. 3) Avaliar o impacto da exposição na saúde dos trabalhadores.
Resumo do projeto ⁽¹⁾	O tolueno é um composto que se encontra maioritariamente presente em colas, combustíveis, tintas e produtos de limpeza. Deste modo, pretende-se dosear os metabolitos deste composto em urinas de trabalhadores de oficinas de manutenção de aeronaves.
Metodologia de recolha de dados	1) A recolha de urinas dos trabalhadores deverá ser feita durante os meses de setembro e outubro de 2015. 2) Durante o mês de setembro far-se-á a recolha de urina à 2ª e à 6ª feira: recolha feita imediatamente antes e após as 8 horas de trabalho. 3) Será feito um estudo idêntico, durante o mês de outubro, mas com recolha de urina a 3 dias da semana (2ª, 4ª e 6ª feiras).

Assinatura do docente ⁽²⁾	Maria Edite S.O. Torres	Data	23.6.2015
--------------------------------------	-------------------------	------	-----------


Espaço reservado à Direção do ISCSEM

Decisão	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Direção do ISCSEM ⁽³⁾		Data	23.6.2015

Espaço reservado à Entidade a quem é enviado o pedido de autorização

Decisão	<input checked="" type="checkbox"/> Autorizada a recolha de dados <input type="checkbox"/> Não autorizada a recolha de dados		
Confidencialidade	<input type="checkbox"/> Não		
Responsável ⁽⁴⁾	HELISUPORTE, S.A. Aeródromo de Cascais - Tiroa Linha 1000-2000 de Rana	Data	01/07/15

2. Mini Exame de Estado Mental (*Mini-Mental State Examination* - MMSE)

Mini-Mental State Examination (MMSE)		
Patient's Name: _____		Date: _____
<i>Instructions: Score one point for each correct response within each question or activity.</i>		
Maximum Score	Patient's Score	Questions
5		"What is the year? Season? Date? Day? Month?"
5		"Where are we now? State? County? Town/city? Hospital? Floor?"
3		The examiner names three unrelated objects clearly and slowly, then the instructor asks the patient to name all three of them. The patient's response is used for scoring. The examiner repeats them until patient learns all of them, if possible.
5		"I would like you to count backward from 100 by sevens." (93, 86, 79, 72, 65, ...) Alternative: "Spell WORLD backwards." (D-L-R-O-W)
3		"Earlier I told you the names of three things. Can you tell me what those were?"
2		Show the patient two simple objects, such as a wristwatch and a pencil, and ask the patient to name them.
1		"Repeat the phrase: 'No ifs, ands, or buts.'"
3		"Take the paper in your right hand, fold it in half, and put it on the floor." (The examiner gives the patient a piece of blank paper.)
1		"Please read this and do what it says." (Written instruction is "Close your eyes.")
1		"Make up and write a sentence about anything." (This sentence must contain a noun and a verb.)
1		"Please copy this picture." (The examiner gives the patient a blank piece of paper and asks him/her to draw the symbol below. All 10 angles must be present and two must intersect.) 
30		TOTAL

Interpretation of the MMSE:

Method	Score	Interpretation
Single Cutoff	<24	Abnormal
Range	<21	Increased odds of dementia
	>25	Decreased odds of dementia
Education	21	Abnormal for 8 th grade education
	<23	Abnormal for high school education
	<24	Abnormal for college education
Severity	24-30	No cognitive impairment
	18-23	Mild cognitive impairment
	0-17	Severe cognitive impairment

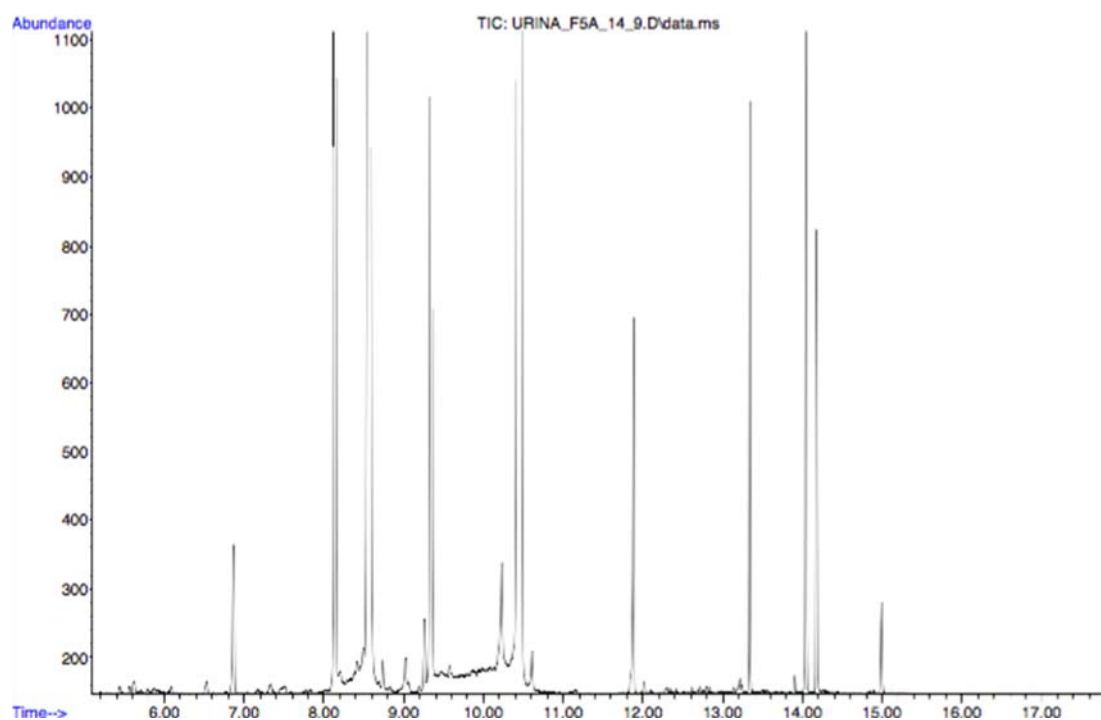
Interpretation of MMSE Scores:

Score	Degree of Impairment	Formal Psychometric Assessment	Day-to-Day Functioning
25-30	Questionably significant	If clinical signs of cognitive impairment are present, formal assessment of cognition may be valuable.	May have clinically significant but mild deficits. Likely to affect only most demanding activities of daily living.
20-25	Mild	Formal assessment may be helpful to better determine pattern and extent of deficits.	Significant effect. May require some supervision, support and assistance.
10-20	Moderate	Formal assessment may be helpful if there are specific clinical indications.	Clear impairment. May require 24-hour supervision.
0-10	Severe	Patient not likely to be testable.	Marked impairment. Likely to require 24-hour supervision and assistance with ADL.

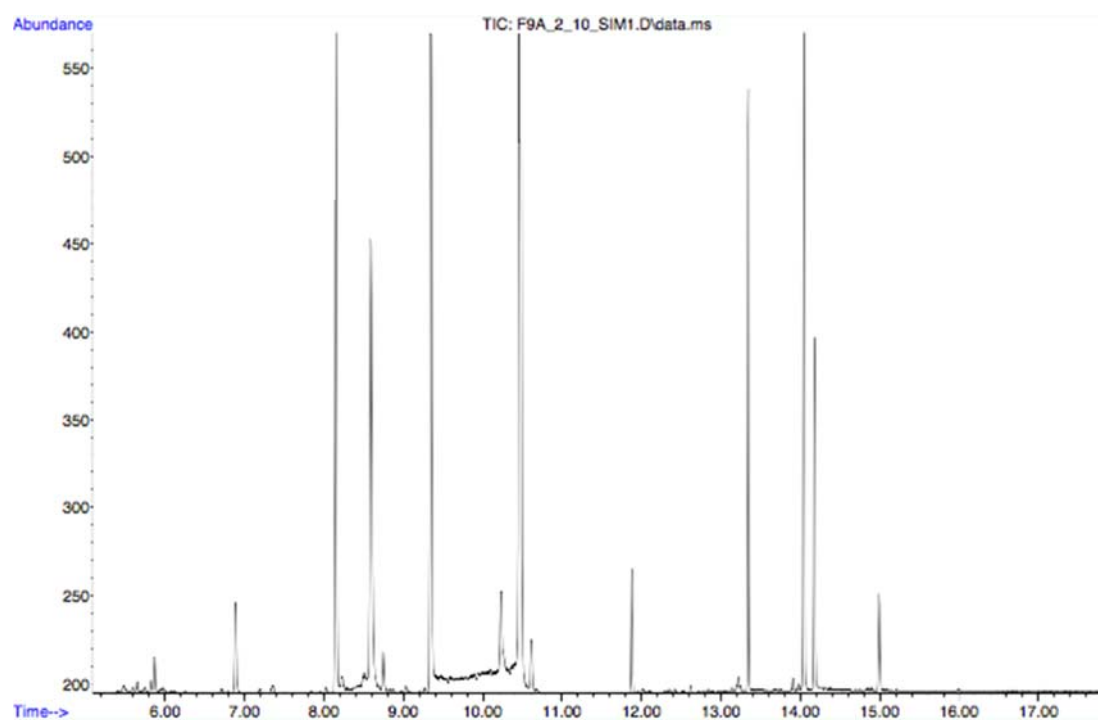
Source:

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR: "Mini-mental state: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." *J Psychiatr Res* 12:129-138.

3. Cromatogramas



Cromatograma obtido da análise realizada à urina de um dos TMA's, F5A. Os tempos de retenção registrados para HA e IS, foram respectivamente 8,141 e 9,346 minutos.



Cromatograma obtido da análise realizada à urina de um dos TMA's, F9A. Os tempos de retenção registrados para HA e IS, foram respectivamente 8,150 e 9,347 minutos.